

**Nouveau composé adjuvant de l'immunité,
compositions le contenant et procédés
mettant en œuvre ledit composé adjuvant**

5 DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte au domaine des composés adjuvants de l'immunité, c'est-à-dire des composés capables d'induire une augmentation de la réponse immunitaire à l'encontre d'un antigène, afin d'augmenter l'efficacité de la stimulation de la réponse immunitaire
10 par une composition immunogène, ou encore d'augmenter l'efficacité préventive ou thérapeutique d'une composition vaccinale.

ETAT DE LA TECHNIQUE

De manière générale, les composés ou compositions ayant une
15 fonction d'adjuvant de l'immunité sont utiles pour améliorer les conditions de stimulation d'une réponse immunitaire à l'encontre des antigènes. Classiquement, les composés ou les compositions adjuvants de l'immunité sont utilisés pour augmenter la quantité d'anticorps produits à l'encontre d'un antigène déterminé, ou pour augmenter la quantité des
20 cellules T effectrices produites, qu'il s'agisse de cellules T auxiliaires (« T helper ») ou de cellules T-cytotoxiques.

En général, l'association d'un antigène avec un composé ou une composition adjuvant de l'immunité, outre le fait d'accroître le niveau de la réponse immunitaire, par une plus grande production d'anticorps ou de
25 cellules T effectrices spécifiques de l'antigène, permet également de réduire la quantité d'antigène incluse dans une composition immunogène ou vaccinale, et, le cas échéant, de réduire la fréquence d'injection de ladite composition immunogène ou vaccinale.

L'association d'un adjuvant de l'immunité avec l'antigène d'intérêt
30 est en particulier requise lorsque les propriétés d'immunogénicité de cet antigène d'intérêt, lorsqu'il est administré sans adjuvant, sont insuffisantes pour stimuler une réponse immunitaire efficace compte-tenu des objectifs d'immunisation poursuivis.

Selon leur nature, les composés ou compositions adjuvants de
35 l'immunité induisent une meilleure réponse immunitaire à l'encontre d'un

antigène d'intérêt selon des voies distinctes. Certains adjuvants de l'immunité agissent sur le système immunitaire en induisant une production plus efficace d'anticorps à l'encontre de l'antigène d'intérêt, par exemple en activant les macrophages, les cellules dendritiques, les

5 cellules B et les cellules T, ou en améliorant les conditions dans lesquelles l'antigène d'intérêt est présenté aux différentes cellules immuno-compétentes.

Les composés ou compositions adjuvants de l'immunité peuvent augmenter la réponse immunitaire en prolongeant la durée de libération

10 de l'antigène d'intérêt, en augmentant la quantité d'antigène absorbée par les cellules présentatrices de l'antigène, en régulant positivement l'apprêtement de l'antigène (« Antigen Processing ») par ces cellules, en stimulant la libération des cytokines, en stimulant la commutation isotypique (« Isotypic switching ») et la maturation des cellules B et/ou en

15 éliminant les cellules immuno-suppressives.

Parmi les différents composés ou compositions adjuvants de l'immunité, ceux qui permettent une meilleure présentation du ou des antigènes d'intérêt aux cellules immuno-compétentes, et tout particulièrement aux lymphocytes T auxiliaires (cellules « T Helper » ou

20 « CD4⁺ ») ou aux lymphocytes T-cytotoxiques (cellules « CTL » ou « CD8⁺ »), revêtent un grand intérêt pour la mise au point de compositions immunogènes ou de compositions vaccinales efficaces. Les cellules du système immunitaire qui apprêtent les antigènes en les fragmentant en peptides, puis en présentant ces peptides, en association

25 avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou de classe II, sont essentiellement les macrophages et les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques sont capables d'apprêter les antigènes, puis de présenter les peptides issus de l'apprêtement des antigènes aux cellules T naïves. Les cellules dendritiques activent les

30 cellules T de manière plus efficace que n'importe quelle autre cellule présentatrice de l'antigène. Elles sont de plus requises pour l'activation initiale des cellules T naïves, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

Les cellules dendritiques sont généralement présentes, dans l'organisme, à des localisations exposées aux antigènes étrangers, tels

35 que la peau, le foie, l'intestin, le sang et les tissus lymphoïdes.

Globalement, les cellules dendritiques sont classées selon qu'elles sont à un stade immature ou à un stade mature. Les cellules dendritiques matures sont capables de capter les antigènes par endocytose et de les apprêter de manière efficace, et également d'exprimer de hauts niveaux de molécules co-stimulatrices, telles que les molécules CD40, CD80 et CD86, ainsi que les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) HLA-DR. De plus, les cellules dendritiques matures expriment le marqueur CD83 et sécrètent de hauts niveaux de diverses cytokines et chimiokines qui agissent en tant qu'auxiliaires à l'activation des cellules

5 T.

Outre leur rôle d'activation des cellules T naïves, les cellules dendritiques matures peuvent également influencer l'équilibre de la réponse immunitaire Th1/Th2. Diverses études ont indiqué que les cellules dendritiques activent préférentiellement les réponses de type Th1, vraisemblablement grâce à la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques activées. (Macatonia et al., 1995, J. Immunol., vol.154 :5071 ; Hilkens et al., 1997, blood, vol.90 : 1920). Toutefois, de nombreux travaux ont montré que les cellules dendritiques peuvent induire indifféremment la génération de clones de cellules Th1 ou Th2. (Roth et al., 1996, Scand. J. Immunol., vol.43 :646).

Le rôle important joué par les cellules dendritiques dans la présentation de l'antigène et l'activation des cellules T a suscité un grand intérêt en vue d'utiliser ou d'activer des cellules dendritiques en immunothérapie. L'activation ou l'obtention de cellules dendritiques matures revêt un intérêt particulièrement important dans le domaine des vaccins et de l'immunothérapie des cancers.

Dans l'état de la technique, on a montré que les acides nucléiques contenant des séquences d'oligonucléotides de type CpG étaient capables d'induire la maturation des cellules dendritiques. Récemment, on a aussi utilisé des cellules dendritiques autologues obtenues à partir de patients cancéreux dans le cadre d'immunothérapie des cancers, comme cela est décrit notamment dans la demande PCT publiée sous le N°WO 98/23728. Il a aussi été montré que des composés chimiques contenant un système cyclique choisi parmi les systèmes cycliques du type imidazoquinoline, imidazopyridine, cycloalkylimidazopyridine,

imidazonaphthyridine ou imidazotétrahydronaphthyridine, étaient capables d'induire *in vitro* la maturation de cellules dendritiques immatures, comme cela est décrit dans le brevet US N°6,558, 951.

- Il existe un besoin dans l'état de la technique pour de nouveaux composés adjuvants de l'immunité capables d'activer les cellules dendritiques et d'induire leur maturation, en vue d'obtenir une réponse immunitaire de haut niveau à l'encontre d'un antigène d'intérêt, que ce soit par la production d'une grande quantité d'anticorps spécifiques de cet antigène d'intérêt, ou que ce soit par la stimulation de la prolifération de cellules T auxiliaires ou de cellules T-cytotoxiques spécifiques de cet antigène d'intérêt.

SOMMAIRE DE L'INVENTION

- Selon la présente invention, il a été caractérisé une nouvelle famille de composés adjuvants de l'immunité, du type peptide, qui activent les cellules dendritiques et induisent la maturation de cellules dendritiques immatures.

- Les composés adjuvants de l'immunité selon l'invention sont dérivés du domaine tête (knob) de la protéine « fibre » (« fiber protein ») de la capsid d'un adénovirus.

Plus précisément, l'invention a pour objet un composé adjuvant de l'immunité consistant en :

- un polypeptide (i) comprenant une séquence d'acides aminés de 30 acides aminés de longueur contenue dans le domaine « tête » de la protéine « fibre » de la capsid d'un adénovirus, ladite séquence d'acides aminés comprenant l'enchaînement d'acides aminés formant la structure en double feuillet β désignée « EF » contenue dans ledit domaine « tête » ; ou
- un peptide (ii) analogue dudit polypeptide (i) dont la séquence en acides aminés comporte, par rapport à la séquence dudit polypeptide (i), au moins une substitution ou au moins une délétion d'un acide aminé, ledit peptide analogue conservant ladite structure en double feuillet β désignée « EF ».

L'invention concerne aussi une composition adjuvante de l'immunité comprenant un composé adjuvant tel que défini ci-dessus, en association avec au moins un excipient physiologiquement compatible.

Elle a également trait à une composition immunogène ainsi qu'à
5 une composition vaccinale comprenant un composé adjuvant tel que défini ci-dessus, en association avec au moins un antigène d'intérêt.

L'invention est également relative à un procédé pour la maturation *in vitro* des cellules dendritiques immatures humaines ou animales, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

10 a) cultiver *in vitro* une population de cellules enrichies en cellules dendritiques immatures humaines ou animales, dans un milieu de culture approprié ; et

b) incuber les cellules cultivées à l'étape a) avec un composé adjuvant ou une composition adjuvante telles que définies ci-dessus,
15 pendant une durée suffisante à induire la maturation des cellules dendritiques.

L'invention concerne aussi une population de cellules enrichie en cellules dendritiques matures, susceptibles d'être obtenues par le procédé de maturation ci-dessus.

20 L'invention a également pour objet une composition adjuvante de l'immunité, caractérisée en ce qu'elle comprend une population de cellules dendritiques matures obtenues selon le procédé de maturation ci-dessus.

L'invention est également relative à un procédé pour stimuler *in vitro* des cellules T spécifiques de l'antigène, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) obtenir une population de cellules enrichies en cellules dendritiques matures par le procédé de maturation ci-dessus ;

b) mettre en contact la population de cellules enrichies en cellules
30 dendritiques matures obtenues à l'étape a) avec une population de cellules enrichies en cellules T provenant du même individu, homme ou animal.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : schéma de la structure de la protéine fibre chez des virions d'adénovirus de sérotype 5, respectivement sauvages (figure 1A) et des virus dépourvus du domaine « tête » (figure 1B).

La protéine fibre de l'adénovirus comprend trois domaines structuraux, en partant de l'extrémité N-terminale jusqu'à l'extrémité C-terminale : La « queue » qui est liée de manière non-covalente à la partie « penton base »; la « tige » et le domaine « tête » se liant au récepteur CAR, qui est responsable de l'attachement de l'adénovirus aux cellules permissives. L'adénovirus sauvage de sérotype Ad5 possède des « fibres » comprenant une longue « tige » possédant 22 répétitions du motif en feuillet β . Avec le vecteur mutant dépourvu du domaine « tête » utilisé selon l'invention (AdE1° Δ knob, voir figure 4C), la « tige » de la protéine fibre est plus courte, avec sept répétitions du motif en feuillet β et se terminent par un motif de trimérisation suivi d'un codon stop « opale ».

Figure 2 : effet des composants de capside de l'adénovirus sur le phénotype des cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques ont été cultivées dans le milieu de culture seul (NS ; cellules dendritiques non stimulées), ou en présence des protéines purifiées de l'adénovirus Ad5 (1 μ g par 10^6 cellules), ou de LPS (1 μ g/ml) ; puis ont été caractérisées pour leur expression du marqueur CD11c et des marqueurs de maturation spécifique des cellules dendritiques.

Figure 2A : cellules dendritiques cultivées avec Hx et Pb (penton base lié à la fibre) isolées à partir de cellules HeLa infectées par l'adénovirus Ad5.

Figure 2B : cellules dendritiques cultivées avec des protéines recombinantes Hx, Pb ou Fi purifiées à partir de cellules Sf9 infectées par un baculovirus, ou avec une protéine Pn (penton) purifiée à partir de cellules HeLa infectées par l'adénovirus Ad5.

Les valeurs d'intensité moyenne de fluorescence (MFI) sont apparentes sur les différents panneaux de la figure 2A et apparaissent

en ordonnées sur la figure 1B. Les résultats présentés sont représentatifs de trois essais indépendants.

Figure 3 : effet dose-dépendant de la protéine tête de l'adénovirus Ad5 sur la maturation des cellules dendritiques.

5 Les cellules dendritiques ont été incubées en l'absence « cellules dendritiques non stimulées, NS » ou en présence de 1µg de protéine Fi ou de protéine du domaine tête (figure 3A), où les cellules dendritiques ont été incubées avec des quantités déterminées de protéines Fi et Hx (respectivement 1 µg) et des concentrations variées de protéines tête
10 (dans une gamme allant de 0,5 à 0,02µg) (figures 3B, 3C).

Les cellules dendritiques et les surnageants de culture ont été recueillis et testés comme indiqué ci-dessous. Pour la figure 1A, les cellules dendritiques ont été caractérisées pour l'expression du marqueur CD11c et les marqueurs de maturation. Les pourcentages de cellules
15 CD11c⁺ et les valeurs moyennes d'immunofluorescence (MFI) pour les marqueurs de maturation ont été représentées.

Pour la figure 3B, des nombres croissants de cellules dendritiques ont été utilisées comme cellules stimulantes, avec des cellules T CD4⁺ allogéniques purifiées. Les valeurs de prolifération cellulaire, testée par incorporation de ³H-thymidine, est exprimée en cpm (moyenne de trois
20 essais ; m ± SD).

Pour la figure 3C, les quantités de IL12 p70 et de TNFα ont été déterminées par une technique ELISA à partir de surnageant de culture des cellules dendritiques, et les résultats ont été exprimés en
25 nanogramme par 10⁶ cellules. Les données sont représentatives d'au moins trois essais indépendants et les valeurs de déviation standard (SD), situées dans la fourchette de 15% des valeurs moyennes, ne sont pas représentées.

Figure 4 : preuve d'une interaction directe entre la protéine du
30 domaine tête et les cellules dendritiques, et preuve de la nécessité du domaine tête dans la maturation des cellules dendritiques induites par l'adénovirus Ad5.

Pour la figure 4A, des cellules dendritiques purifiées à l'aide de billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD11c ont été stimulées
35 avec 0,5µg de protéine du domaine tête ; des cellules dendritiques

purifiées non stimulées (NS) ont été utilisées comme témoins. En abscisse, on a représenté les pourcentages de cellules CD11c⁺ et les valeurs moyennes d'immunofluorescence (MFI) pour les marqueurs de maturation.

- 5 Pour la figure 4B, les cellules dendritiques ont été stimulées avec 1 µg de protéine Fi (protéine fibre complète), puis incubées avec des anticorps monoclonaux de souris anti-domaine queue de la protéine fibre (anti-Fi-tail). Le pourcentage de cellules fluorescentes ayant fixé la protéine fibre a été déterminé après soustraction de la fixation non
10 spécifique d'anticorps monoclonaux anti-Fi sur des cellules dendritiques non stimulées (NS-DC).

- Pour la figure 4C, les cellules dendritiques n'ont pas été stimulées (NS), ou ont été stimulées avec, respectivement, soit le virus Ad5E1° portant une protéine fibre sauvage (WT-Fi-Carrying Ad5E1°) ou avec le
15 vecteur Ad5E1°Δ knob dépourvu du domaine tête, à raison de 1x10⁴ particule par cellule. Sur les histogrammes, sont représentées les valeurs moyennes d'immunofluorescence (MFI) pour les marqueurs de maturation des cellules CD11c⁺. Les résultats présentés sont représentatifs de deux essais indépendants.

- 20 Figure 5 : absence d'expression du récepteur CAR sur les cellules dendritiques et faible permissivité des cellules dendritiques vis-à-vis de l'infection par l'adénovirus de sérotype 5 .

- Des cellules dendritiques immatures isolées avant toute stimulation ont été incubées avec du liquide d'ascite contenant des
25 anticorps monoclonaux anti-CAR (ligne en gras), ou avec un liquide d'ascite non apparenté (ligne en gris).

- Les cellules dendritiques ont été analysées par cytométrie de flux (FACS). Les cellules HeLa et CHO ont été utilisées respectivement
comme témoins positifs et négatifs.

- 30 Figure 6 : cartographie de la région du domaine tête de la fibre impliquée dans la maturation des cellules dendritiques.

 Figure 6A : représentation schématique de la structure conformationnelle du domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus Ad5 (Xia et al., 1994).

Ce diagramme montre les différentes régions A à J ayant une structure de feuillet β ainsi que les boucles de liaison respectives AB, CD, DG, GH, HI et IJ.

Sur la ligne supérieure on a indiqué la numérotation des acides aminés, en partant du résidu méthionine N-terminale de la protéine fibre complète de l'adénovirus Ad5. Les régions du domaine tête de la protéine fibre interagissant avec le récepteur CAR sont représentées sous la forme de boîtes noires pleines sur la ligne inférieure de la figure.

La figure 6B est une représentation linéaire des différents mutants de délétion du domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus Ad5. La séquence du domaine tête est indiquée par des boîtes pleines ; les régions délétées sont indiquées sous la forme de lignes fines.

Pour la figure 6C, on a utilisé, comme cellules stimulantes vis-à-vis de cellules TCD4⁺ allogéniques purifiées, respectivement, des cellules dendritiques non stimulées (NS), des cellules dendritiques stimulées avec des extraits sans tête domaine (MS ; « mock-stimulated »), ou des cellules dendritiques stimulées avec la protéine du domaine tête sauvage (« knob WT ») ou avec des mutants de délétion du domaine tête de la protéine fibre. Les résultats présentés consistent en des moyennes de trois essais séparés. Dans les résultats présentés, on peut noter que seul 0,5 μ g de protéine du domaine tête ont été utilisées, à comparer avec 2 μ g de protéine mutante.

Figure 7 : les cellules dendritiques stimulées avec le domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus Ad5 stimule *in vivo* des cellules TCD8⁺ spécifiques pour le peptide antigénique GP33 dérivé de la glycoprotéine du LCMV.

La figure 7A illustre le rejet de cellules donneuses par des souris receveuses vaccinées avec les cellules dendritiques. Des splénocytes de souris B6 marqués avec le CFSE (5-6-carboxyfluorescein diacétate succinimidyl ester) ont été chargés avec le peptide GP33, puis les splénocytes traités ont été transfusés dans des souris receveuses B6 qui ont été préalablement immunisées avec, respectivement, (i) des cellules dendritiques stimulées avec le domaine tête de la protéine fibre (respectivement $2,5 \times 10^5$, 9×10^4 et 3×10^4 cellules), chargées avec GP33 ou (ii) avec des cellules dendritiques chargées avec GP33 ($2,5 \times 10^5$

cellules) stimulées avec Pb ou Hx, ou non stimulées (NS), ou (iii) avec des cellules dendritiques chargées avec NP366 ($2,5 \times 10^5$) stimulées avec le domaine tête de la protéine fibre, ou (iv) avec le peptide GP33 en émulsion dans de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA).

5 Le niveau de rejet, exprimé en pourcentage, a été calculé dans le sang et dans la rate à différents moments après le transfert cellulaire adoptif.

La figure 7B représente la sécrétion d'IFN- γ *ex vivo* par les mêmes souris que pour la figure 7A. Des cellules de rate et des lymphocytes du sang périphérique (PBL) fraîchement isolés ont été incubés pendant 20 heures avec le peptide GP33; évaluation du nombre des cellules spécifiques du GP33 sécrétant de l'IFN- γ par un test Elispot IFN- γ ; les résultats sont exprimés en SFC ("spot forming colony")/ 10^5 cellules T CD8 $^+$ (moyenne de test réalisé en triple \pm SD). Chaque spot correspond à une cellule sécrétant l'IFN- γ .

La figure 7C illustre l'activité cytolytique de cellules effectrices dérivées de souris vaccinées avec des cellules dendritiques (3×10^4 cellules) et non stimulées ou stimulées avec le domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus Ad5. Après une stimulation de 4 jours *in vitro* avec le peptide GP33, les cellules de rate ont été incubées avec les cellules cibles EL4 marquées au ^{51}Cr puis chargées avec le peptide GP33 ou le peptide NP366, dans un test de relargage de chrome seules les activées spécifiques du GP33 lyseront les cibles (^{51}Cr).

25 DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

Selon l'invention, on a montré que le domaine tête de la protéine fibre de capsid d'un adénovirus est capable d'interagir directement avec des cellules dendritiques immatures et de provoquer leur activation et leur maturation en cellules dendritiques matures.

Les adénovirus se présentent comme des particules de forme icosaédrique de 70 à 100 nanomètres de diamètre, selon le sérotype. La capsid virale comprend deux éléments constitutifs majeurs, respectivement, (i) l'hexon (Hx) qui forme les faces et le penton (Pn) situé aux 12 sommets.

La base du penton (ou penton-base) est associée à la protéine fibre, qui est une projection spiculaire émanant de la base du penton, constituée d'un trimère de polypeptide IV. La fibre est une protéine de 581 à 587 résidus d'acides aminés pour les espèces d'adénovirus à fibres longues, comme les espèces C et A, et de 319 à 325 résidus d'acides aminés pour les fibres les plus courtes comme celles des adénovirus de sérotypes 3 et 7, appartenant à l'espèce B.

Les fibres sont toutes formées de trois domaines structuraux distincts, respectivement la queue, la tige et la tête. La queue s'insère dans le penton-base. La tige est constituée de la répétition périodique d'un motif d'une quinzaine de résidus formant chacun une structure en feuillet β . Le nombre des répétitions du motif unitaire définit la longueur de la tige, qui est variable entre les fibres des différentes espèces d'adénovirus. A l'extrémité C-terminale de la fibre se trouve une zone renflée, la tête, qui est formée d'un trimère d'une séquence polypeptidique de 180 à 200 résidus d'acides aminés. Comme cela est représenté sur la figure 6A, chaque monomère de tête associe un squelette de huit feuillets β anti-parallèles reliés entre eux par des boucles dont la conformation varie considérablement selon les sérotypes.

Certains auteurs avaient démontré que l'adénovirus humain était capable de faire maturer les cellules dendritiques humaines et murines *in vitro* (Rea et al., 99 ; Hirshowitz et al., 2000 ; Morelli et al., 2000 ; Rouard et al., 2000). Toutefois, ces observations fortuites de l'activité des vecteurs adénoviraux sur la matière et sur les cellules dendritiques ne permettaient pas d'identifier quelle était la voie d'activation et de maturation des cellules dendritiques. Ainsi, ces résultats antérieurs ne permettaient pas de déterminer objectivement quel était le mécanisme moléculaire d'activation et de maturation des cellules dendritiques induit par l'adénovirus ni, a fortiori, le constituant ou la combinaison de constituants de l'adénovirus susceptible d'en constituer le ou les agent(s) causals, notamment parmi les douze polypeptides majeurs constitutifs de la particule virale.

On a désormais montré selon l'invention qu'un polypeptide constitué d'un fragment du domaine tête de la protéine fibre d'un

adénovirus, ledit fragment comprenant la séquence d'acides aminés formant la structure en double feuillet β anti-parallèle désignée « EF » induit l'activation et la maturation de cellules dendritiques immatures.

5 Plus précisément, on a montré selon l'invention qu'un fragment peptidique du domaine tête de la protéine fibre d'un adénovirus comprenant la séquence d'acides aminés délimitant le feuillet β anti-parallèle EF et délété dans d'autres régions peptidiques du domaine tête, comme par exemple le feuillet β anti-parallèle « HI », possède des propriétés d'activation et de maturation des cellules dendritiques
10 immatures identiques à celles observées pour un polypeptide comprenant la séquence complète du domaine tête de la protéine fibre dudit adénovirus.

En revanche, il a aussi été montré qu'un polypeptide constitué du domaine tête de la protéine fibre et qui comprend la délétion de la
15 séquence d'acides aminés formant la structure en feuillet β antiparallèle EF a perdu les propriétés d'activation et de maturation des cellules dendritiques immatures du domaine tête complet. Encore plus précisément, il a été montré qu'un polypeptide constitué du domaine tête et comprenant la délétion de deux acides aminés dans la région F du
20 feuillet β antiparallèle EF ne possède pas les propriétés d'activation et de maturation des cellules dendritiques immatures qui sont observées avec un polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés complète du domaine tête.

Ainsi, les résultats obtenus par le demandeur montrent qu'un
25 polypeptide constitué d'un fragment peptidique du domaine tête de la protéine fibre d'un adénovirus, et qui comprend la séquence d'acides aminés formant la structure en double feuillet β antiparallèle EF, ledit polypeptide ne comprenant pas les séquences d'acides aminés formant d'autres structures en feuillet β contenues dans le domaine tête, est
30 capable d'induire l'activation et la maturation des cellules dendritiques immatures.

Les résultats obtenus par le demandeur montrent que les propriétés d'activation et de maturation des cellules dendritiques immatures du domaine tête de la protéine fibre d'un adénovirus sont

portées par une petite région peptidique dudit domaine tête, les régions d'acides aminés formant la structure en double feuillet β EF.

Le domaine tête de la protéine fibre de tous les adénovirus possède une structure commune constituée d'une succession de feuillets β reliés entre eux par des boucles peptidiques, similaires à celles du domaine tête de l'adénovirus de sérotype 5 (Ad5) représentée sur la figure 6A.

Le demandeur a aussi montré que, au moins du point de vue des propriétés d'activation et de maturation des cellules dendritiques immatures, cette identité de structure du domaine tête de l'ensemble des adénovirus impliquait aussi une identité de fonction. Ainsi, on a montré selon l'invention qu'un vecteur adénoviral comprenant des protéines fibres chimères constituées d'une queue et d'une tige provenant d'un adénovirus de sérotype 5 et un domaine tête provenant d'un adénovirus de sérotype 3 est capable également d'induire l'activation et la maturation des cellules dendritiques immatures.

Les résultats ci-dessus ont permis aux demandeurs de définir une famille nouvelle de composés adjuvants de l'immunité, dérivée du domaine tête de la protéine fibre d'un adénovirus, cette nouvelle famille de composés adjuvants de l'immunité constituant un premier objet de l'invention.

L'invention a pour objet un composé adjuvant de l'immunité consistant en :

- un polypeptide (i) comprenant une séquence d'acides aminés de 30 acides aminés de longueur contenue dans le domaine « tête » de la protéine « fibre » de la capside d'un adénovirus, ladite séquence d'acides aminés comprenant l'enchaînement d'acides aminés formant la structure en double feuillet β désignée « EF » contenue dans ledit domaine « tête » ; ou
- un peptide (ii) analogue dudit polypeptide (i) dont la séquence en acides aminés comporte, par rapport à la séquence dudit polypeptide (i), au moins une substitution ou au moins une délétion d'un acide aminé, ledit peptide analogue conservant ladite structure en double feuillet β désignée « EF ».

On a montré dans les exemples qu'un composé adjuvant répondant à la définition ci-dessus induit la maturation des cellules dendritiques immatures. En particulier, un composé adjuvant ci-dessus induit l'expression par les cellules dendritiques des molécules de classe I et de classe II du CMH, ainsi que des marqueurs spécifiques des cellules dendritiques matures, tels que les marqueurs CD40, CD80 et CD86. Les cellules dendritiques stimulées par un composé adjuvant tel que défini ci-dessus induisent la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ allogéniques dans des essais de réaction lymphocytaire mixte (MLR) et induit également la sécrétion d'IL-12 et de TNF α de manière dose dépendante. Un composé adjuvant selon l'invention agit directement sur les cellules dendritiques immatures sans fixation sur le récepteur CAR.

Pour les composés adjuvants de l'invention constitués d'un polypeptide (i), ledit polypeptide (i) a une séquence d'acides aminés d'au moins 30 acides aminés de longueur puisque le polypeptide (i) comprenant dans tous les cas une séquence d'acides aminés de 30 acides aminés de longueur contenant la séquence d'acides aminés formant le feuillet β EF du domaine tête de la protéine fibre d'un adénovirus, qui porte la fonction de maturation des cellules dendritiques immatures.

Pour les composés adjuvants de l'immunité constituée d'un peptide (ii) analogue du polypeptide (i), ledit peptide (ii) analogue possède une structure très proche du polypeptide (i) et conserve la caractéristique structurale essentielle de contenir une séquence d'acides aminés formant la structure en double feuillet β antiparallèle EF.

Dans un peptide (ii) analogue, la séquence d'acides aminés du feuillet β EF peut comprendre, par rapport à la séquence d'acides aminés du feuillet β EF du domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus dont elle dérive, une ou plusieurs substitutions d'un acide aminé. Toutefois, la ou les substitutions d'acides aminés dans la séquence du feuillet β EF sont telles qu'elles ne modifient pas ladite structure en feuillet β .

Toutefois, de manière tout à fait préférée, la séquence d'acides aminés formant le feuillet β EF d'un peptide (ii) analogue est identique à la séquence d'acides aminés du feuillet β EF du polypeptide (i) parent.

Selon un aspect préféré d'un composé adjuvant selon l'invention, l'enchaînement d'acides aminés formant la structure en double feuillet β EF est localisée approximativement au centre de la séquence d'acides aminés dudit polypeptide.

Par exemple, la séquence d'acides aminés du feuillet β EF du domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus de sérotype 5 a une longueur de 8 acides aminés. Comme cela est montré sur la figure 6A, cette séquence d'acides aminés débute au résidu d'acide aminé en position 479 et se termine au résidu d'acide aminé localisé en position 486 de la protéine fibre complète de l'adénovirus de sérotype 5. Pour un composé adjuvant constitué d'un polypeptide (i) ayant la longueur minimale de 30 acides aminés, la séquence d'acides aminés du feuillet β EF, de 8 acides aminés, est précédée, à l'extrémité N-terminale, d'une séquence de 11 acides aminés de longueur correspondant à une partie de la boucle DE et est suivie, du côté C-terminal, d'une séquence de 11 acides aminés de longueur comprenant une partie de la boucle FG.

La séquence d'acides aminés du feuillet β EF contenue dans un polypeptide (i) adjuvant selon l'invention est localisée « approximativement » au centre de la séquence d'acides aminés du polypeptide (i) lorsque les séquences localisées respectivement du côté N-terminal et du côté C-terminal de la séquence du feuillet β EF n'ont pas une longueur identique. Par exemple, la longueur des séquences localisées respectivement du côté N-terminal et du côté C-terminal de la séquence d'acides aminés du feuillet β EF peuvent différer d'une longueur allant jusqu'à 20 acides aminés, l'une par rapport à l'autre.

Selon un autre aspect préféré d'un polypeptide (i) adjuvant selon l'invention, ledit polypeptide (i) comprend, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, les séquences d'acides aminés de la boucle DE, du feuillet β EF et de la boucle FG.

A titre illustratif, pour un polypeptide (i) de ce type dérivé de la protéine fibre de l'adénovirus de sérotype 5, ledit composé adjuvant est constitué du polypeptide dont la séquence en acides aminés débute au

résidu d'acide aminé en position 463 et se termine au résidu d'acide aminé en position 515 de la séquence de la protéine fibre complète. Pour ce composé adjuvant, la séquence d'acides aminés du feuillet β EF est localisée « approximativement » au centre de la séquence d'acides aminés du polypeptide (i), bien que la séquence d'acides aminés de la boucle FG, à l'extrémité C-terminale, possède une longueur de 12 résidus d'acides aminés supérieure à celle de la boucle DE localisée à l'extrémité N-terminale.

De manière générale, un composé adjuvant selon l'invention du type polypeptide (i) a une longueur d'au moins 30 acides aminés, et d'au plus 195 acides aminés et de manière tout à fait préférée d'au plus 180 acides aminés.

Ainsi, un composé adjuvant selon l'invention du type polypeptide (i) a une longueur d'au moins 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190 ou 195 acides aminés de longueur.

Selon un premier mode de réalisation préféré d'un composé adjuvant de l'immunité consistant en un polypeptide (i) tel que défini ci-dessus, la séquence dudit polypeptide (i), d'une longueur de « n » acides aminés, consiste en une séquence de « n » acides aminés consécutifs d'une séquence correspondante contenue dans le domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus considéré. Il y a donc identité en acides aminés entre la séquence du composé adjuvant du type polypeptide (i) et la séquence de la partie correspondante du domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus considéré.

Selon un second mode de réalisation préféré, le polypeptide (i), d'une longueur de « n » acides aminés, comprend une séquence de « x » acides aminés consécutifs du domaine tête et comprenant la séquence du feuillet β EF ainsi qu'une ou deux séquences d'acides aminés additionnelles, la longueur totale des séquences d'acides aminés additionnelles étant de « n - x » acides aminés, localisées à l'extrémité N-terminale et/ou à l'extrémité C-terminale de la séquence du domaine tête de « x » acides aminés. Il doit être compris que « n » est un nombre entier compris entre 30 et 195 et que « x » est un nombre entier compris entre 30 et « n-x ».

Dans un composé adjuvant du type polypeptide (i), la ou les séquences additionnelles, autres que la séquence partielle du domaine tête de la protéine fibre qui comprend la séquence du feuillet β EF, peuvent consister en des séquences de peptides détectables par des anticorps spécifiques d'un tel peptide, qui pourra donc être utilisé comme marqueur.

Selon un autre aspect, les séquences additionnelles peuvent consister en des séquences permettant une purification plus aisée du composé adjuvant après sa synthèse, que ce soit par synthèse chimique ou par synthèse par recombinaison génétique. A titre illustratif d'un tel aspect, les séquences additionnelles sont choisies parmi des séquences de polyhistidine, par exemple des séquences comprenant de 4 à 10, et de préférence 6, résidus d'histidine. Ces séquences peuvent aussi consister en des peptides ou polypeptides destinés à faciliter la purification du composé adjuvant, telle que la GST.

De manière tout à fait préférée, la séquence de « x » acides aminés additionnelle est localisée du côté C-terminale de la séquence du domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus considéré.

Selon un autre mode de réalisation, un composé adjuvant selon l'invention du type polypeptide (i) comprend une séquence d'acides aminés du domaine tête de la protéine fibre d'un adénovirus qui comprend, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, le feuillet β D. La boucle peptidique DE, le feuillet β EF et la boucle peptidique FG du domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus considéré. Pour le domaine tête de l'adénovirus de sérotype 5, un tel polypeptide (i) possède une séquence d'acides aminés débutant à l'acide aminé en position 454 et se termine à l'acide aminé en position 515 de la protéine fibre complète, comme cela est représenté sur la figure 6A.

Selon encore un autre mode de réalisation préféré, un composant adjuvant selon l'invention, du type polypeptide (i), comprend une séquence d'acides aminés du domaine tête qui comprend, de l'extrémité N-terminale, vers l'extrémité C-terminale, respectivement la boucle peptidique DE, le feuillet β EF, la boucle peptidique FG et le feuillet β G.

A titre illustratif, pour le domaine tête de l'adénovirus de sérotype 5, un tel polypeptide (i) comprend la séquence débutant à l'acide aminé

en position 463 et se terminant à l'acide aminé en position 521 de la protéine fibre complète, comme cela est représenté sur la figure 6.

Selon encore un autre mode de réalisation préféré, un composé adjuvant du type polypeptide (i) comprend, de l'extrémité N-terminale
5 vers l'extrémité C-terminale, respectivement le feuillet β D, la boucle peptidique DE, le feuillet β EF, la boucle peptidique FG et le feuillet β G.

A titre illustratif, pour le domaine tête de l'adénovirus de sérotype 5, un tel polypeptide (i) comprend la séquence d'acides aminés débutant à l'acide aminé en position 454 et se terminant à l'acide aminé en
10 position 521 de la protéine fibre complète.

Selon encore un autre mode de réalisation particulier d'un composé peptidique adjuvant de l'invention, le polypeptide (i) ou le peptide (ii) analogue comprend également, en plus de la séquence d'acides aminés du domaine tête de fibre, également la dernière sous-
15 unité de répétition de la tige de fibre. Un tel composé adjuvant peptidique selon l'invention comprenant la dernière sous-unité de répétition de la tige de fibre est susceptible de posséder une grande stabilité de structure et de bloquer la partie du domaine tête dans sa conformation native et sous forme d'un trimère peptidique.

A titre illustratif de ce mode de réalisation particulier d'un composé adjuvant peptidique de l'invention qui comprend un polypeptide (i) dérivé de la protéine fibre de l'adénovirus de sérotype 5, ledit polypeptide (i) comprend la séquence d'acides aminés débutant au résidu d'acide aminé en position 380 et se terminant au résidu d'acide aminé en
25 position 581 de la séquence d'acides aminés de la protéine fibre complète.

Selon une caractéristique préférée d'un composé adjuvant selon l'invention, le polypeptide (i) comprend une partie du domaine tête de la protéine fibre d'un adénovirus qui est un adénovirus humain.

30 Avantageusement, l'adénovirus humain est choisi parmi les adénovirus du sous-groupe B, qui comprend les adénovirus Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34 et Ad35, ou parmi les adénovirus du sous-groupe C, qui comprend les adénovirus Ad1, Ad2, Ad5 et Ad6.

Préférentiellement, l'adénovirus humain est choisi dans le groupe
35 constitué des adénovirus des sérotypes 12 18, 31, 3, 7, 11, 14, 16, 21,

34, 35, 1, 2, 5, 6, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 4, 40 et 41.

De préférence, un peptide adjuvant selon l'invention dérive du domaine tête de la protéine fibre d'un adénovirus choisi parmi Ad5, Ad3 et Ad12.

Les protéines fibres complètes des adénovirus Ad5, Ad3 et Ad12 sont représentées comme les séquences d'acides aminés SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 et SEQ id N°3, respectivement.

Le domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus Ad5 débute au résidu d'acide aminé en position 400 de la séquence SEQ ID N°1.

Le domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus Ad3 débute au résidu d'acide aminé en position 132 de la séquence SEQ ID N°2.

Le domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus Ad12 débute au résidu d'acide aminé en position 409 de la séquence SEQ ID N°3.

Les structures cristallines des protéines fibres des adénovirus Ad5, Ad3 et Ad12 ont été décrites par Xia et al. (1994), Dumort et al. (2001) et Bewley et al. (1999), respectivement.

Selon encore un autre aspect préféré d'un composé adjuvant selon l'invention, celui-ci est caractérisé en ce que le polypeptide (i) comprend une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences suivantes :

- la séquence débutant à l'acide aminé en position 463 et se terminant à l'acide aminé en position 515 de la séquence SEQ ID N° 1
- la séquence débutant à l'acide aminé en position 195 et se terminant à l'acide aminé en position 247 de la séquence SEQ ID N° 2.
- la séquence débutant à l'acide aminé en position 472 et se terminant à l'acide aminé en position 535 de la séquence SEQ ID N° 3.

Comme cela a déjà été décrit précédemment, un mode de réalisation particulier du composé adjuvant selon l'invention, consiste en un peptide (ii) analogue du polypeptide (i) défini ci-dessus, dont la séquence en acides aminés comporte, par rapport à la séquence dudit polypeptide (i), au moins une substitution ou au moins une délétion d'un acide aminé, ledit peptide analogue conservant la structure double feuillet β EF.

De manière tout à fait préférée, la ou les substitution(s) ou délétion(s) d'un acide aminé, par rapport à la séquence du polypeptide (i) est (sont) localisée(s) dans la partie du peptide (ii) analogue dérivée de la séquence du domaine tête de la protéine fibre d'adénovirus
5 contenue dans le polypeptide (i) parent.

De préférence, le peptide analogue (ii) adjuvant comprend 2,3,4,5,6,7,8,9 ou 10 substitutions ou délétions d'un acide aminé, par rapport à la séquence d'acides aminés du polypeptide (i) parent.

Selon encore un autre mode de réalisation d'un composé adjuvant
10 de l'immunité selon l'invention, ledit composé adjuvant est caractérisé en ce que le polypeptide (i) ou le peptide analogue (ii) consiste en un polypeptide cyclique.

Les peptides (ii) adjuvants qui comprennent dans leur séquence une ou plusieurs différences en acides aminés par rapport à la séquence
15 correspondante contenue dans le domaine tête de la protéine fibre naturelle de l'adénovirus considéré, possède néanmoins des propriétés adjuvantes, c'est-à-dire des propriétés d'induire la maturation des cellules dendritiques immatures, du même ordre de grandeur que le polypeptide (i) parent dont il dérive.

20 De manière générale, l'invention est relative à des peptides adjuvants dérivés du domaine tête de la protéine fibre d'un adénovirus qui possède la même activité adjuvante que les peptides adjuvants spécifiquement décrits dans la présente description.

Comme cela est montré dans les exemples, la propriété d'un
25 composé adjuvant selon l'invention d'induire la maturation des cellules dendritiques immatures peut être aisément vérifiée par l'homme de l'art, par exemple en déterminant le niveau d'expression des molécules du CIMH de classe I ou de classe II, ou encore le niveau d'expression de marqueur spécifique de la maturation de cellules dendritiques, telles que
30 les molécules CD40, CD80 et CD86.

Les autres tests décrits dans les exemples peuvent également être utilisés par l'homme de l'art pour vérifier la capacité adjuvante de maturation des cellules dendritiques d'un composé selon l'invention, tel que :

(i) la capacité du composé adjuvant à stimuler des cellules dendritiques immatures à induire une réaction lymphocytaire mixte en présence de cellules TCD4⁺ allogéniques ;

5 (ii) la capacité des cellules dendritiques stimulées avec un composé adjuvant de l'invention, et chargées avec un antigène, à induire une réponse immunitaire par l'induction de la prolifération de cellules TCD8⁺ spécifiques dudit antigène, et encore plus spécifiquement des cellules TCD8⁺ sécrétant de l'interféron gamma.

10 (iii) La capacité d'un composé adjuvant selon l'invention à stimuler la production d'IL-12 et de TNF α par les cellules dendritiques.

De préférence, dans la séquence d'un peptide analogue (ii), un acide aminé contenu dans la séquence du polypeptide (i) parent est substitué par un acide aminé de la même classe d'acide aminé, parmi les classes des acides aminés acides (D, E), basiques (K, R, H), non polaires (A, V, L, I, P, M, F, W) ou encore des acides aminés polaires non chargés (G, S, T, Y, N, Q).

20 De préférence, la partie du peptide (ii) analogue dérivée de la séquence du domaine tête du polypeptide (i) parent d'une longueur de (x) acides aminés, à une identité en acides aminés avec la séquence correspondante de longueur (x) du polypeptide (i) parent d'au moins 80%, avantageusement d'au moins 95% et de manière tout à fait préférée d'au moins 98%.

25 Le « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides aminés, au sens de la présente invention, est déterminé en comparant les deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

30 La partie de la séquence d'acides aminés dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des « gaps ») par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal entre les deux séquences.

35 Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles un résidu d'acide aminé identique est observé pour les deux séquences comparées, puis en divisant le nombre de positions auxquelles il y a identité entre les deux résidus d'acide aminé par le

nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par cent afin d'obtenir le pourcentage d'identité en acides aminés des deux séquences entre elles.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut
5 être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus.

De manière tout à fait préférée, le pourcentage d'identité de séquence est déterminé à l'aide du logiciel CLUSTAL W (version 1.82) les paramètres étant fixés comme suit : (1) CPU MODE = ClustalW mp ; (2) ALIGNMENT = « full » ; (3) OUTPUT FORMAT = « aln w/numbers » ;
10 (4) OUTPUT ORDER = « aligned » ; (5) COLOR ALIGNMENT = « no » ; (6) KTUP (word size) = « default » ; (7) WINDOW LENGTH = « default » ; (8) SCORE TYPE = « percent » ; (9) TOPDIAG = « default » ; (10) PAIRGAP = « default » ; (11) PHYLOGENETIC TREE/TREE TYPE = « none » ; (12) MATRIX = « default » ; (13) GAP
15 OPEN = « default » ; (14) END GAPS = « default » ; (15) GAP EXTENSION = « default » ; (16) GAP DISTANCES = « default » ; (17) TREE TYPE = « cladogram » et (18) TREE GRAP DISTANCES = « hide ».

Un composé adjuvant peptidique selon l'invention peut être
20 synthétisé par des méthodes classiques de chimie de synthèse, soit des synthèses chimiques homogènes en solution ou en phase solide.

A titre illustratif, l'homme de l'art peut utiliser les techniques de synthèse polypeptide en solution décrite par HOUBEN WEIL (1974).

Un composé adjuvant peptidique selon l'invention peut être
25 également synthétisé chimiquement en phase liquide ou solide par des couplages successifs des différents résidus d'acides aminés (de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale en phase liquide, ou de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale en phase solide) . L'homme de l'art peut notamment utiliser la technique de synthèse
30 peptidique en phase solide décrite par Merrifield (1965a ; 1965b).

Selon un autre aspect, un composé adjuvant peptidique selon l'invention peut être synthétisé par recombinaison génétique, par exemple selon un procédé de production comprenant les étapes suivantes :

(a) préparer un vecteur d'expression dans lequel a été inséré un acide nucléique codant le composé adjuvant peptidique de l'invention, ledit vecteur comprenant également les séquences régulatrices nécessaires à l'expression dudit acide nucléique dans une cellule hôte choisie ;

(b) transfecter une cellule hôte avec le vecteur recombinant obtenu à l'étape (a) ;

(c) cultiver la cellule hôte transfectée à l'étape b) dans un milieu de culture approprié ;

(d) récupérer le surnageant de culture des cellules transfectées ou le lysat cellulaire desdites cellules, par exemple par sonication ou par choc osmotique ; et

(e) séparer ou purifier, à partir dudit milieu de culture, ou à partir du culot de lysat cellulaire, le composé adjuvant peptidique recombinant de l'invention.

Pour produire un composé adjuvant peptidique recombinant de l'invention, l'homme de l'art peut notamment se référer aux techniques de préparation des vecteurs recombinants, de transfection cellulaire et de purification qui sont décrites dans les exemples.

De manière tout à fait préférée, on utilise un vecteur de type baculovirus pour infecter des cellules Sf9, comme cela est décrit dans les exemples.

Pour purifier un composé peptidique adjuvant de l'immunité selon l'invention qui a été produit par des cellules hôtes transfectées ou infectées par un vecteur recombinant codant ledit composé adjuvant peptidique, l'homme de l'art peut avantageusement mettre en œuvre des techniques de purification décrites par Molinier-Frenkel (2002), par Karayan et al. (1994) ou par Novelli et al. (1991).

Comme cela a déjà été mentionné précédemment dans la présente description, du fait que les cellules dendritiques matures favorisent le développement des réponses immunitaires, les réponses immunitaires à médiation cellulaire l'un quelconque des composés peptidiques adjuvant selon l'invention peut être utilisé en association avec un antigène à l'encontre duquel une réponse immunitaire est recherchée.

Un composé adjuvant peptidique selon l'invention peut être associé, en vue d'induire une réponse immunitaire, chez l'homme ou l'animal, indifféremment avec un antigène peptidique ou avec un antigène du type carbohydrate, par exemple un antigène du type
5 carbohydrate identique ou similaire, du point de vue de sa reconnaissance antigénique, à un antigène spécifiquement exprimé par des cellules tumorales.

Par définition, le composé adjuvant peptidique selon l'invention peut être associé avec tout type d'antigène à l'encontre duquel une
10 réponse immunitaire est recherchée.

Selon un mode de réalisation particulier, un composé adjuvant peptidique de l'invention est couplé chimiquement à un ou plusieurs antigènes à l'encontre desquels une réponse immunitaire est recherchée, sous la forme d'un conjugué peptide adjuvant/peptide
15 antigène ou encore sous la forme d'un conjugué peptide adjuvant-antigène carbohydrate.

Ainsi, la présente invention a également pour objet un conjugué immunogène constitué d'un composé peptidique adjuvant selon l'invention, qui est lié de manière covalente à un antigène à l'encontre
20 duquel une réponse immunitaire est recherchée.

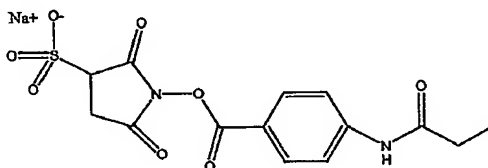
L'invention a également pour objet une composition adjuvante de l'immunité comprenant un composé adjuvant peptidique tel que défini ci-dessus dans la présente description, en association avec au moins un excipient physiologiquement compatible.

25 Dans un mode de réalisation particulier du conjugué immunogène de l'invention, le composé adjuvant et l'antigène sont liés directement entre eux de manière covalente, par exemple via une liaison peptidique-CO-NH-.

Cependant, afin d'introduire une certaine flexibilité dans la structure du conjugué immunogène, et notamment de permettre une
30 mobilité dans l'espace du composé adjuvant et de l'antigène, l'un par rapport à l'autre au sein du conjugué immunogène, on préfère un conjugué peptidique dans lequel le composé adjuvant et l'antigène sont séparés l'un de l'autre, au sein dudit conjugué, par une chaîne espaceur.

Selon un premier mode de réalisation préféré d'un conjugué immunogène, le composé adjuvant et l'antigène sont séparés l'un de l'autre, au sein dudit conjugué, par une chaîne espaceur choisie parmi le SMCC ou le SIAB, qui sont tous les deux des composés bifonctionnels.

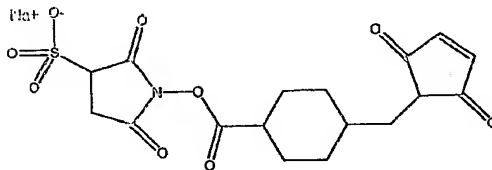
- 5 Le composé SIAB, décrit par Hermanson G.T. (1996, Bioconjugate techniques, San Diego : Academic Press, pp 239-242), est le composé de formule (I) suivante :



10 (I)

- Le composé SIAB comprend deux groupes réactifs, respectivement un groupe iodoacétate et un groupe ester Sulfo-NHS, ces groupes réagissant respectivement sur des groupes amino et sulfhydryl.

Le composé SMCC, qui est décrit par Samoszuk M.K. et al. (1989, Antibody, Immunoconjugates Radiopharm., 2(1) : 37-46), est le composé de formule (II) suivante :



(II)

Le composé SMCC comprend deux groupes réactifs, respectivement un groupe ester Sulfo-NHS et un groupe maléimide, qui réagissent respectivement avec un groupe amino et un groupe sulfhydryl.

5 Selon un second mode de réalisation préféré, le conjugué immunogène comprend une chaîne espaceur constituée d'un peptide espaceur linéaire . On choisira de préférence un peptide espaceur linéaire ayant de 3 à 30 acides aminés de longueur, avantageusement de 5 à 20 acides aminés de longueur et de manière tout à fait préférée
10 de 7 à 15 acides aminés de longueur.

Préférentiellement, le peptide espaceur linéaire est essentiellement, voire exclusivement, constitué d'acides aminés chargés positivement ou négativement à pH 7,0 afin d'accroître l'hydrophilicité globale dudit conjugué peptidique immunogène. On comprend que l'on
15 devra éviter d'utiliser des peptides espaceurs constitués d'acides aminés hydrophobes. De manière préférentielle, le peptide espaceur est caractérisé en ce qu'il est constitué d'une chaîne de poly-(lysine) constituée de 3 à 30 résidus lysine, avantageusement de 5 à 20 et de manière tout à fait préférée de 7 à 15 résidus lysine de longueur.

20 Selon encore un autre mode de réalisation d'un conjugué immunogène selon l'invention, le composé adjuvant et l'antigène sont séparés l'un de l'autre, au sein dudit conjugué peptidique, par une chaîne espaceur constituée d'un peptide espaceur ramifié, de préférence une structure oligodendrimérique de poly(lysine), telle que décrite par
25 exemple par Basak et al. (1995).

Dans ce dernier mode de réalisation d'un conjugué immunogène selon l'invention, ledit conjugué peptidique peut comprendre plusieurs copies respectivement du composé adjuvant et/ou de l'antigène par molécule de conjugué, avantageusement de 2 à 8 copies du composé
30 adjuvant et/ou de l'antigène, de préférence au plus 4 du composé adjuvant et/ou de l'antigène, par molécule de conjugué.

La présente invention a encore pour objet un composé adjuvant peptidique tel que défini précédemment dans la description, pour son utilisation en tant que principe actif adjuvant d'une composition
35 immunogène ou d'une composition vaccinale.

Par « composition immunogène », on entend selon l'invention, une composition contenant un composé adjuvant peptidique tel que défini ci-dessus en association avec au moins un antigène à l'encontre duquel une réponse immunitaire à médiation cellulaire est recherchée, dans le

5 but de produire des anticorps spécifiques à l'encontre dudit antigène.

Par « composition vaccinale », on entend selon l'invention une composition contenant un composé peptidique adjuvant tel que défini ci-dessus, en association avec au moins un antigène à l'encontre duquel une réponse immunitaire à médiation cellulaire est recherchée en vue de

10 prévenir ou en vue de traiter une maladie, en particulier une maladie provoquée par un agent pathogène de type viral, fongique ou bactérien ou encore une tumeur.

L'invention est également relative à l'utilisation d'un composé adjuvant peptidique tel que défini ci-dessus pour la fabrication d'une

15 composition immunogène ou vaccinale.

Elle concerne aussi une composition immunogène ou une composition vaccinale comprenant un composé adjuvant peptidique tel que défini ci-dessus, en association avec au moins un antigène .

Dans une composition immunogène ou dans une composition

20 vaccinale de l'invention, l'antigène peut être utilisé sous la forme d'un mélange avec le composé peptidique adjuvant de l'invention.

Selon un autre mode de réalisation, le composé adjuvant peptidique et l'antigène inclus dans une composition vaccinale ou dans une composition immunogène de l'invention se présentent sous la forme

25 d'un conjugué immunogène tel que défini ci-dessus.

Dans les exemples, on a montré que des cellules dendritiques stimulées avec un composé adjuvant peptidique selon l'invention et chargé avec un antigène déterminé, en l'occurrence le peptide GP33 du LCMV, était capable d'induire, chez l'animal, une réponse immunitaire

30 cytotoxique par stimulation de cellules T CD8⁺ spécifiques de l'antigène GP33.

On a montré en particulier que des cellules dendritiques matures stimulées par un composé adjuvant peptidique selon l'invention et présentant l'antigène d'intérêt aux cellules du système immunitaire

35 étaient capables d'induire une réponse immunitaire de type cytotoxique

provoquant le rejet de splénocytes présentant à leur surface l'antigène d'intérêt.

Dans une composition immunogène ou dans une composition vaccinale selon l'invention, tout type d'antigène peut être utilisé puisque,
5 dans tous les cas, et quel que soit l'antigène ou les antigènes, le peptide adéquat de l'invention exercera son activité d'activation des cellules dendritiques.

De préférence, une composition immunogène ou une composition vaccinale selon l'invention comprend une quantité allant de 10
10 nanogrammes à 1 milligramme d'un composé adjuvant peptidique tel que défini ci-dessus, de préférence de 100 nanogrammes à 100 microgrammes dudit composé peptidique adjuvant, et de manière tout à fait préférée de 100 nanogrammes à 10 microgrammes dudit composé peptidique adjuvant.

15 Parmi les antigènes susceptibles d'être inclus dans une composition immunogène ou dans une composition vaccinale selon l'invention, en association avec un composé adjuvant peptidique, on peut citer les antigènes bactériens dérivés notamment de *B. pertussis*,
Leptospira pomona, *S. paratyphi AB*, *C. diphtheriae*, *C. tetani*, *C.*
20 *botulinum*, *C. perfringens*, *C. fesceri*, *B. anthracis*, *P. pestis*, *P. multocida*,
V. cholerae, *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Hemophilus influenzae*, *Treponema pallidum*.

Les antigènes peuvent être également des antigènes viraux tels que des antigènes dérivés des virus poliovirus, adénovirus, virus du para
25 influenza, virus respiratoires syncytiaux, virus de l'influenza, virus de l'encéphalomyélite, virus de la maladie de Newcastle, pox virus, virus rabbi-
que.

Les antigènes peuvent également consister en des antigènes provenant d'un allergène quelconque, tels que des allergènes dérivés
30 d'extraits de pollen de fleur ou d'herbe, des allergènes purifiés à partir de poussière domestique, etc..

Parmi les antigènes viraux d'intérêt, on cite aussi les antigènes dérivés des protéines des papillomavirus, notamment des papillomavirus humains, et en particulier les protéines L1, E6 et E7, notamment des
35 souches HPV-16.

D'autres antigènes viraux illustratifs consistent en des antigènes dérivés des protéines du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), en particulier du VIH-1, et de manière tout à fait préférée dérivés de la protéine ENV du virus VIH-1.

5 D'autres antigènes d'intérêt susceptibles d'être inclus dans une composition immunogène ou dans une composition vaccinale selon l'invention consistent en des antigènes tumoraux, c'est-à-dire des antigènes exprimés par des cellules cancéreuses, que ces antigènes soient de nature peptidique ou de nature carbohydrate.

10 Comme on l'a compris, les compositions immunogènes ou les compositions vaccinales selon l'invention trouvent leur emploi notamment dans le traitement, tant curatif que préventif, des cancers, notamment des cancers induits par des virus comme par exemple l'ATL(acute T leukemia) provoqués par le virus HTLV1, ou le cancer du
15 col utérin provoqué par les papillomavirus, ou encore le lymphome de burkitt ou le sarcome de Kaposi provoqué par des virus de la famille Herpès, respectivement Epstein-barr (EBV) et le HHV8, ainsi que dans le traitement du SIDA ou encore pour prévenir ou traiter des réactions inflammatoires allergiques.

20 Selon encore un autre aspect, l'invention a encore pour objet une méthode pour immuniser un homme ou un animal, plus spécifiquement un mammifère, à l'encontre d'un antigène d'intérêt, ladite méthode comprenant une étape au cours de laquelle on administre à l'homme ou à l'animal une composition immunogène ou une composition vaccinale
25 telle que définie ci-dessus.

On administre à l'homme ou à l'animal, par exemple aux patients, une composition immunogène ou une composition vaccinale selon l'invention qui se présente sous une forme adaptée à l'administration systémique ou mucosale, par exemple par voie intranasale, en quantité
30 suffisante pour être efficace sur le plan thérapeutique, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement. Une composition immunogène ou une composition vaccinale selon l'invention se présente sous forme solide ou liquide, en particulier sous la forme d'une émulsion huile-dans-l'eau dans lequel l'antigène ou les antigènes d'intérêt est(sont) dispersés. Pour
35 formuler une composition immunogène ou une composition vaccinale

selon l'invention sous la forme d'une émulsion huile-dans-l'eau, l'homme de l'art pourra utiliser une émulsion du type SPT telle que décrite à la page 147 de l'ouvrage « Vaccin Design, The subunit and adjuvant approach », [M.POWELL, M. Newman Ed., Plenum Press, (1995)] ainsi que l'émulsion MF59 décrite à la page 183 du même ouvrage.

Par « excipient physiologiquement compatible » au sens de l'invention, on entend un agent de charge liquide ou solide, un diluant ou tout autre substance non-physiologiquement active et présentant une grande innocuité pour le patient qui peut être utilisée pour l'administration systémique ou locale, par exemple sur les muqueuses, d'une composition immunogène ou une composition vaccinale selon l'invention.

De tels excipients physiologiquement compatibles sont décrits en détail notamment dans la 4^{ème} édition « 2002 » de la Pharmacopée Européenne ainsi que dans l'édition USP 26-NF21 publiée en Novembre 2002.

Selon encore un autre aspect, l'invention est également relative à un procédé pour la maturation *in vitro* des cellules dendritiques immatures humaines ou animales dans lequel des cellules dendritiques immatures sont stimulées avec un composé adjuvant peptidique tel que défini dans la présente description.

L'invention a donc encore pour objet un procédé pour la maturation *in vitro* des cellules dendritiques immatures humaines ou animales, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) cultiver *in vitro* une population de cellules enrichies en cellules dendritiques immatures humaines ou animales, dans un milieu de culture approprié ;

(b) incuber les cellules cultivées à l'étape (a) avec un composant adjuvant peptidique ou encore avec une composition adjuvante telle que définie dans la présente description, pendant une durée suffisante à induire la maturation des cellules dendritiques.

La population de cellules enrichies en cellules dendritiques immatures humaines ou animales utilisée à l'étape a) du procédé peut être obtenue à partir d'un échantillon de moelle osseuse ou encore un échantillon de sang humain ou animal, selon des techniques bien

connues de l'homme de l'art, comme par exemple la technique décrite par Mayordomo et al. (1995).

Pour purifier et cultiver des cellules dendritiques, l'homme de l'art peut également se référer à la technique décrite par Steinam et Young (1991). L'homme de l'art peut également se référer aux nombreuses références bibliographiques concernant la purification et la culture des cellules dendritiques qui sont décrites dans la demande PCT publiée sous le n°WO 98/23728, et plus spécifiquement aux pages 1 à 3.

Pour obtenir une population de cellules enrichies en cellules dendritiques immatures humaines ou animales, l'homme de l'art peut également se référer à la technique décrite dans les exemples.

A l'étape b) du procédé de maturation ci-dessus, les cellules dendritiques immatures sont incubées avec une concentration finale du composé adjuvant peptidique allant de 10 nanogrammes par ml à 1 µg/ml, de préférence allant de 50 nanogrammes par ml à 1 µg/ml.

A l'étape b) du procédé de maturation, les cellules dendritiques immatures sont incubées pendant une durée allant de 1h à 48 heures, avec la concentration finale sélectionnée du composé adjuvant peptidique.

L'invention est également relative à une population de cellules enrichies en cellules dendritiques matures chargées avec un composé adjuvant ou avec une composition adjuvante telles que définies ci-dessus. Un composé adjuvant selon l'invention peut donc être détecté, par exemple à l'aide d'un anticorps dirigé spécifiquement contre ce composé adjuvant, indifféremment dans le cytoplasme ou à la surface membranaire de ces cellules dendritiques qui sont susceptibles d'être obtenues par le procédé de maturation tel que défini ci-dessus.

Les cellules dendritiques matures obtenues selon le procédé de maturation ci-dessus sont caractérisées en ce qu'elles expriment simultanément les molécules de classes I et de classe II du CMH ainsi que les marqueurs spécifiques des cellules dendritiques matures CD40 CD80 et CD86.

La présente invention a aussi pour objet une composition cellulaire adjuvante de l'immunité, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'une population de cellules dendritiques matures chargées (i) avec un

composé adjuvant ou avec une composition adjuvante telles que définies ci-dessus, et (ii) chargées avec l'antigène d'intérêt susceptibles d'être obtenues par le procédé de maturation ci-dessus.

De préférence, une dose de composition cellulaire adjuvante de l'immunité telle que définie ci-dessus, pour l'administration aux patients, comprend un nombre de cellules dendritiques matures allant de 10^6 à 10^9 cellules dendritiques matures syngéniques, avantageusement de 10^7 à 10^9 cellules syngéniques.

Dans une composition cellulaire adjuvante selon l'invention, les cellules dendritiques matures sont de préférence en suspension dans un milieu liquide salin nécessaire à leur survie pendant quelques heures, de préférence au moins trois heures.

De manière tout à fait préférée, les cellules dendritiques matures sont en suspension dans un milieu de culture approprié comprenant la totalité des éléments nutritifs permettant leur survie à long terme, par exemple pendant plusieurs jours, de préférence pendant au moins 2 jours.

L'invention est également relative à un procédé pour fabriquer une composition cellulaire immunogène, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) cultiver *in vitro* une population de cellules enrichies en cellules dendritiques immatures humaines ou animales, dans un milieu de culture approprié;

b) incuber les cellules cultivées à l'étape a) avec un composé peptidique adjuvant ou encore avec une composition adjuvante telle que définie précédemment, pendant une durée suffisante pour induire la maturation des cellules dendritiques ;

c) ajouter aux cellules cultivées à l'étape b) au moins un antigène d'intérêt à l'encontre duquel une réponse immunitaire est recherchée.

Selon le procédé ci-dessus, l'étape c) d'incubation des cellules dendritiques avec au moins un antigène d'intérêt peut indifféremment être simultané à l'étape b) dans laquelle le composé peptidique adjuvant est incubé avec les cellules, ou au contraire être postérieur à l'étape b). Toutefois, et de manière tout à fait préférée, les étapes b) et c) sont réalisées de manière simultanée.

L'invention a également pour objet un procédé pour fabriquer une composition cellulaire immunogène caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) cultiver *in vitro* une population de cellules enrichies en cellules dendritiques humaines ou animales dans un milieu de culture approprié;
- b) incuber les cellules cultivées à l'étape a) avec un conjugué immunogène tel que défini précédemment, pendant une durée suffisante pour induire la maturation des cellules dendritiques.

Dans les procédés pour fabriquer une composition cellulaire immunogène ci-dessus, la concentration finale ajoutée aux cellules dendritiques est variable selon la nature et le poids moléculaire de l'antigène d'intérêt considéré. Par exemple, le peptide GP33 du LCMV est ajouté aux cellules dendritiques. Pour chaque antigène d'intérêt considéré, l'homme de l'art pourra adapter la concentration finale qui doit être ajoutée à l'étape c) (premier procédé), ou la concentration finale de conjugués immunogènes qui doit être ajoutée à l'étape b) du procédé (second procédé), grâce à ses connaissances techniques générales concernant le chargement de cellules dendritiques avec un antigène d'intérêt.

Les conditions générales des procédés de fabrication d'une composition cellulaire immunogène ci-dessus sont par ailleurs identiques à celles utilisées pour le procédé de maturation de cellules dendritiques qui a été décrit précédemment.

L'homme de l'art peut également se référer aux exemples du présent brevet dans lesquels sont donnés tous les détails de préparation d'une composition cellulaire immunogène selon l'invention.

L'invention a également pour objet une composition cellulaire immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend une population de cellules dendritiques matures chargées avec l'antigène d'intérêt obtenu par les procédés pour sa fabrication qui sont décrits ci-dessus.

Les cellules dendritiques matures chargées avec l'antigène d'intérêt sont caractérisées en ce qu'elles expriment les molécules de classe I et de classe II du CMH, ainsi que les marqueurs spécifiques des cellules dendritiques matures CD40, CD80 et CD86. De plus, ces cellules présentent à leur surface des fragments peptidiques de

l'antigène d'intérêt à l'encontre duquel une réponse immunitaire est recherchée

L'invention est également relative à une méthode pour immuniser un organisme humain ou animal à l'encontre d'un antigène d'intérêt, laquelle méthode comprend une étape au cours de laquelle on administre à l'individu une composition cellulaire adjuvante telle que définie ci-dessus, préalablement, simultanément, ou postérieurement à une étape d'administration de l'antigène d'intérêt.

L'invention a également pour objet une méthode pour immuniser un organisme humain ou animal à l'encontre d'un antigène d'intérêt, laquelle méthode comprend une étape au cours de laquelle on administre à l'individu une composition cellulaire immunogène selon l'invention.

La présente invention est en outre illustrée par les exemples suivants :

EXEMPLES :

A. MATERIEL ET METHODES

A.1 Préparation des adénovirus (Ad) et des protéines de capsid d'adénovirus (Ad), y compris des composés peptidiques adjuvants selon l'invention.

L'adénovirus Ad5E1 est un adénovirus de sérotype 5 déficient pour la réplication et délété à la fois dans les régions précoces E1 et E3. L'adénovirus Ad5 E1° porte des protéines fibres de type sauvage (WT) (Molinier-Frenkel et al., 2002).

L'adénovirus Ad5E1°Δ knob, mutant de deletion pour la protéine fibre, est dérivé de l'adénovirus Ad5E1° par l'insertion d'un codon stop « opale » dans le gène codant la fibre, en aval du signal de trimérisation extrinsèque contenu dans la tige de la fibre (Magnusson et al., 2001 ; Hong et al., 2003).

La fibre résultante est dépourvue de la totalité du domaine tête (« knobless ») et contient seulement le domaine queue ainsi que les sept motifs répétés de l'extrémité N-terminale de la tige, c'est-à-dire les résidus d'acides aminés 1 à 157 de la protéine fibre.

La figure 1 présente la structure schématique des fibres des adénovirus Ad5E1° et Ad5E1°Δ knob. Les virions Ad5E1° et Ad5E1°Δ knob ont été isolés par ultracentrifugation isopycnique dans un gradient continu de chlorure de césium (Molinier-Frankel et al., 2002). Les

5 protéines de capside Hexon (désignés de manière abrégée « Hx ») et les capsomères de penton (désignés de manière abrégée « Pn », pour la combinaison penton base + fibre) ont été isolés à partir de cellules HeLa infectées avec l'adénovirus de sérotype 5 sauvage WT Ad5.

Les protéines penton-base (aussi désignées « Pb »), fibre (aussi

10 désignées « Fi ») et domaine tête de la fibre de l'adénovirus sauvage de sérotype 5 ont été isolées sous la forme de protéines recombinantes à partir de cellules Sf9 infectées par un baculovirus.

On a également analysé quatre protéines fibres de l'adénovirus Ad5 mutées, portant des délétions de longueur variable dans le domaine

15 tête (Santis et al., 1999), respectivement les protéines mutantes désignées FiΔ402-480, FiΔHI, FiΔEF et FiΔLT485 – 486 sur la figure 6B. Ces protéines fibres mutées ont été produites sous la forme de protéines recombinantes dans les cellules Sf9.

Les protéines d'adénovirus ont été purifiées selon un protocole

20 décrit par Molinier-Frenkel et al. (2002), Karayan et al. (1994) et Novelli et al. (1991). Brièvement, les protéines d'adénovirus ont été purifiées par un procédé comprenant les trois étapes suivantes :

- (i) précipitation au sulfate d'ammonium,
- (ii) chromatographie liquide haute performance à échange

25 d'anions et

- (iii) étape de concentration-ultrafiltration à l'aide de membranes de concentration ayant un seuil de coupure de 100 kDa.

Les échantillons de protéines ont été analysés par les techniques

classiques d'électrophorèse sur gel de SDS 12%-polyacrylamide

30 (Molinier-Frenkel et al., 2002) et d'immuno-empreinte (Karayan et al., 1994).

On a testé la présence possible d'endotoxines dans les préparations de protéine et d'adénovirus, en utilisant le test de lysat d'amœbocyte du *Limulus polyphemus* (E-TOXATE®; sigma), en

utilisant comme témoin standard le lipopolysaccharide (LPS) de *E. coli* du sérotype 055 : B5.

La concentration d'endotoxine dans les différents lots de protéines n'a jamais dépassé 30 pg/ml aux doses utilisées pour la stimulation des cellules dendritiques. A cette concentration, les échantillons de protéine Hx n'ont jamais induit la maturation des cellules dendritiques à un niveau supérieur au bruit de fond des cellules dendritiques non stimulées (voir figure 2). Les virions d'adénovirus purifiés sur gradient de CsCl étaient totalement exempts de contamination détectable par l'endotoxine.

A.2- Obtention et culture des cellules dendritiques.

Le procédé a été adapté à partir de la technique décrite par Mayordomo et al. (1995). Des cellules de moelle osseuse de souris C57BL/6 (H2^b), (Harlan, Gannat, France) déléetées en lymphocytes ont été cultivées pendant une nuit dans un milieu de culture complet (RPMI 1640 additionné de 10% de sérum de veau foetal (FCS), 2 mM L-glutamine, 50 µM-mercaptoéthanol, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine). Les cellules non adhérentes ont été prélevées et remises en suspension dans du milieu de culture complet en présence de 2000 U/ml de GM-CSF recombinant (rGM-CSF, R & D System, Mineapolis, Minnesota) et 100 U/ml d'IL4 recombinante (rIL4, R & D System). Le milieu de culture a été remplacé au jour 4. Au jour 6, des fractions aliquotes des cellules non adhérentes ont été remises en suspension à la densité de 3x10⁶/ml dans du tampon PBS contenant 1% de FCS. Les cellules ont ensuite été incubées pendant une heure à 37°C (i) sans (cellules dendritiques non stimulées ; NS-DC), ou (ii) avec des composants de capsid d'Ad5, ou (iii) avec des fractions chromatographiques correspondantes obtenues à partir des extraits de cellules Sf9 infectées avec un vecteur de baculovirus vide (cellules dendritiques stimulées par le vecteur vide ; MS-DC), comme cela est indiqué dans les légendes des figures.

Après une heure d'incubation, la concentration cellulaire a été ajustée à 3 x 10⁵ cellules par ml avec du milieu complet additionné de GM-CSF. Des cellules témoins ont été incubées avec 1 µg/ml de LPS de *E.coli* (sigma).

Au Jour 8, les cellules ont été récupérées et analysées par des techniques de cytométrie de flux, de réactions mixtes lymphocytaires (MLRs) et des techniques d'immunisation. Au Jour 8, les surnageants de culture ont été recueillis. Pour les expériences décrites et illustrées dans la figure 4A, les cellules dendritiques ont été purifiées en utilisant des billes magnétiques conjuguées avec un anticorps monoclonal anti-CD11c de souris (Miltenyi Biotec).

Les cellules dendritiques ont été lavées dans du tampon PBS contenant 1 % de FCS. Après incubation avec un anticorps anti-FCII/IIIR(2.4G2 ; Pharmingen), les cellules ont été incubées avec des combinaisons variées des anticorps monoclonaux suivants (tous commercialisés par Pharmingen) : anti-I-A^b (AF6-120.1) et anti-CD40(3/23), conjugués à PE anti-CD11c (HL3) et anti-CD80(16-10A1) conjugués à FITC, anti-H2-D^b(28-8-6) et anti-CD86(GL1) biotinylés + streptavidine-PerCP (Becton Dickinson). On a aussi utilisé les anticorps monoclonaux de souris anti-fibre-queue (4D2.5 ; HONG et al., 1997). Pour la coloration du récepteur CAR, des cellules dendritiques au Jour 6, des cellules de la lignée CHO (ATCC N°CCL-61) et des cellules de la lignée Hela CCL-2 ATCC CCL2 et CHO ont été marquées avec un anticorps monoclonal provenant d'ascite E1.1 anti-CAR, ainsi qu'avec un ascite témoin. Une contre coloration a été réalisée en utilisant des IgG anti-souris de rats biotinylé et un conjugué streptavidine-PE. Les analyses en cytométrie de flux ont été réalisées sur un appareil FACSCalibur (Becton Dickinson).

A.3 Tests fonctionnels *in vitro*

Pour les réactions mixtes lymphocytaires (MLRs), des cellules dendritiques au Jour 8 ont été distribuées à des doses croissantes dans des puits de culture et co-cultivées pendant 4 jours avec des fractions aliquotes de splénocytes purifiés CD4⁺ (2×10^5 cellules/puits) allogéniques (Balb/c, H2^d). La prolifération des cellules T CD4⁺ a été mesurée par incorporation de ³H-thymidine (1μCi/puits) pendant les dernières 18 heures de l'étape de co-culture. Pour la mesure de la production d'IL12 et de TNFα, les surnageants de culture des cellules

dendritiques au Jour 8 ont été testés en utilisant les kits ELISA IL12p70 et TNF α (Pharmingen).

A.4 Peptides

5 Le peptide 33-41 de la glycoprotéine du LCMV (KAVYNFATM), et le peptide 366-374 de la nucléoprotéine du virus de l'influenza (ASNENMETM), qui sont désignés de manière abrégée respectivement GP33 et NP366, sont commercialisés par la Société NEOSYSTEM (Strasbourg, France).

10

A.5 Essais d'immunisation et tests de rejet des splénocytes marqués au CFSE.

Des souris C57BL/6 ont été immunisées de manière sous-cutanée (s.c.) dans le flanc avec $2,5 \times 10^5$ cellules dendritiques maturés en présence des différents composants de capsid de l'adénovirus puis chargées avec GP33 ou NP366 (10^{-6} M). Dix jours après, les souris ont reçu une injection intraveineuse de 3×10^7 splénocytes syngéniques marqués avec le colorant fluorescent 5-6-carboxyfluorescein diacétate succinimidyl ester (CFSE ; Molecular Probes) comme décrit par OEHEN et al. (1997). Le pourcentage de cellules donneuses CFSE $^{+}$ au sein des splénocytes ou des lymphocytes du sang périphérique (PBLs) receveur a été déterminé en utilisant une analyse de cytométrie de flux (FACS). Le rejet des cellules du donneur a été calculé en utilisant la formule suivante :

25 ratio du % de cellules CFSE $^{+}$ dans les souris immunisées/ % de cellules CFSE $^{+}$ chez les souris naïves] $\times 100$.

A.6 Tests ELISPOT-IFN γ .

Des microplaques de nitrocellulose (Millipore) ont été recouvertes avec un anticorps de rat anti-IFN γ de souris (R4-6A2 ; Pharmingen), puis les puits ont été lavés et saturés avec du milieu complet. Des fractions aliquotes de splénocytes fraîchement isolés (10^6 cellules/puits), ou de lymphocytes du sang périphérique (PBLs) fraîchement isolés (2×10^5 cellules/puits), en triplicats, ont été ajoutés aux puits de culture dans du milieu complet contenant 30 U/ml de IL2 recombinant humaine (hrIL2,

35

Boehringer) et 10^{-6} M des peptides GP33 ou NP366. Après une culture de 20 heures à 37°C, les cellules sécrétant de l'IFN- γ forment des spots (SFC). Les cellules sont comptées selon la technique décrite par Molinier-Frenkel et al. (2002). Les valeurs obtenues avec le peptide
5 NP366 ont été soustraites de la moyenne des valeurs des tests en triplicats obtenus avec le peptide GP33.

A.7 Tests de cytotoxicité

Des splénocytes de souris immunisées avec les cellules
10 dendritiques ont été cultivés pendant 4 jours avec 10^{-6} M de peptide GP33. Ces cellules ont ensuite été testées en duplicat à différentes quantités de cellules effectrices pour une quantité fixe de cellules cibles EL-4 marquées au ^{51}Cr (10^{-4} μCi par cellule) qui ont été incubées avec le peptide GP33 ou NP366. Après une culture de cinq heures à 37°C, les
15 surnageants de culture ont été recueillis et la radioactivité a été mesurée à l'aide d'un appareil du type Top-Count (Packard Instruments). Dans les échantillons témoins, les cellules EL4 cibles ont été incubées avec le milieu seul afin de déterminer le niveau de relarguage spontané de ^{51}Cr ,
et avec 2% de bromure d'alkyltriméthylammonium (Sigma) afin de
20 déterminer le relarguage total de ^{51}Cr .

B. RESULTATS

EXEMPLE 1 : Effet des composants de capsid isolés de l'adénovirus de sérotype 5 (Ad5) sur le phénotype des cellules dendritiques.

25

Des cellules dendritiques immatures ont été incubées avec les capsomères penton (Pn) ou hexon (Hx) qui ont été purifiées à partir de cellules HeLa infectées avec Ad5. La majorité des cellules dendritiques stimulées avec Hx présentait un faible niveau de phénotype mature,
30 comparé aux cellules dendritiques non stimulées (NS-DC), avec une faible expression des molécules de classe II du CMH, et les molécules CD40, CD80 (B7.1) et CD86 (B.7.2) , comme cela est montré sur la figure 2A. Au contraire, les cellules dendritiques stimulées avec le penton (Pn) ont exprimé massivement un phénotype mature , similaire au
35 phénotype observé pour les cellules dendritiques stimulées par le LPS,

avec un haut niveau d'expression des différents marqueurs, comme cela est illustré sur la figure 2A.

5 Du fait que le capsomère Pn d'adénovirus est constitué de deux entités structurales, respectivement le penton base (Pb) et la fibre (Fi), les expériences suivantes ont été mises au point afin de déterminer laquelle de ces deux protéines constitutives, respectivement Pb ou Fi était responsable de la maturation des cellules dendritiques.

10 Les cellules dendritiques ont été ensuite stimulées avec des protéines recombinantes Pb ou Fi isolées à partir des extraits de cellules d'insectes Sf9 infectées. Les protéines recombinantes complètes Pn et Hx ont été utilisées en tant qu'échantillons témoins.

15 Les résultats obtenus indiquent que la protéine Fi suffit à reproduire la totalité de l'effet stimulant produit par les capsomères Pn, alors que la protéine Pb seule n'induit aucun effet détectable sur la maturation des cellules dendritiques, comme cela est illustré sur la figure 2B.

EXEMPLE 2 : Rôle du domaine tête de la fibre dans la maturation des cellules dendritiques par l'adénovirus et par la protéine fibre.

20 Comme cela est mentionné ci-dessus, la fibre d'adénovirus comprend trois domaine structurels, respectivement, de son extrémité N-terminale vers son extrémité C-terminale, la queue (« tail ») la tige (« schaft ») et la tête (« knob »). Le domaine tête a été exprimé sous la forme d'une protéine recombinante, selon les techniques décrites par
25 NOVELLI et al. (1991) et par Hong et al. (1997). Les cellules dendritiques qui ont été incubées avec le domaine tête de la fibre ont exprimées un phénotype mature, similaire à celui observé avec les cellules dendritiques stimulées avec la protéine fibre Fi complète, comme cela illustré sur la figure 3A.

30 Les cellules dendritiques stimulées avec le domaine tête de la fibre sont capables d'induire fortement la prolifération de cellules T CD4⁺ allogéniques dans un essai de réaction lymphocytaire mixte (MLR) comme cela est illustré sur la figure 3B. De plus, le degré de maturation des cellules dendritiques varie en fonction des concentrations
35 croissantes de protéine du domaine tête de la fibre (figure 3B).

A la dose maximale de protéines de domaine tête utilisée (0,5 µg), les cellules dendritiques stimulées par le domaine tête stimulant des cellules T CD4⁴ allogéniques plus efficacement que les cellules dendritiques témoins non stimulées (NS) ou les cellules dendritiques stimulées avec la protéine Hx.

Cependant, aucun effet détectable n'a été obtenu avec la dose de 0,02 µg de protéine tête. De manière intéressante, la valeur de réaction lymphocytaire mixte (MLR) pour la dose de 0,2 µg de protéine tête était similaire à la valeur obtenue avec une dose de 1 µg de protéine fibre. Ce résultat est compatible avec le fait que la quantité de protéine de tête présente dans un échantillon de 0,2µg de protéine tête correspond grossièrement à la quantité de protéine tête contenue dans un échantillon de 1µg de protéine fibre. La protéine tête a induit également la sécrétion d'IL-12 et de TNFα de manière dose-dépendante, comme cela est illustré sur la figure 3C.

On a ensuite cherché à savoir si le domaine tête était capable de cibler directement les cellules dendritiques et d'induire leur maturation, sans la participation de cellules intermédiaires. Dans ce but, des cellules CD11c⁺ ont été purifiées en utilisant des billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD11c, les cellules CD11c⁺ purifiées ayant été utilisées pour des tests de maturation. Bien que les cellules dendritiques non stimulées soient capables d'augmenter l'expression des molécules du CMH et des molécules co-stimulatrices, les cellules dendritiques stimulées avec le domaine tête expriment un phénotype significativement plus mature que les cellules témoins (figure 3A).

De plus, on a montré que la protéine Fi recombinante était capable de se fixer sur les cellules dendritiques immatures, avec 63% de cellules positives au jour 6 de culture (figure 3B). Dans cette expérience, la protéine Fi liée aux cellules a été détectée en utilisant un anticorps monoclonal anti-queue, ce qui implique que l'épitope contenu dans la queue était accessible, et ce qui suggère que l'attachement de la protéine Fi à la surface cellulaire s'est réalisée via le domaine tête. Ces résultats suggèrent fortement que les cellules dendritiques constituent les cibles directes du domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus.

Afin de déterminer si l'effet du virion Ad5 sur l'activation des cellules dendritiques était aussi directement réalisé par l'intermédiaire du domaine tête de la fibre, on a réalisé des expériences comparatives en utilisant (i) le vecteur Ad5E1°, un vecteur Ad5 portant des projections de fibre Fi sauvage (WT) ou (ii) le vecteur Ad5E1°Δ knob, un vecteur Ad5 dépourvu du domaine tête. Lors de l'incubation avec le vecteur Ad5E1°, on a observé une augmentation de l'expression des marqueurs de maturation des cellules dendritiques (figure 3C), comme cela était attendu au vu des observations antérieures de Hirshowitz et al. (2000) et de Morelli et al. (2000).

En utilisant des doses identiques des particules du vecteur Ad5E1°Δ knob, on a montré que les cellules dendritiques exprimaient un phénotype significativement moins mature qu'après incubation avec le vecteur Ad5E1°.

Ces résultats confirment que le domaine tête de la fibre est le facteur stimulant commun de tous les composants viraux actifs, et que le domaine tête porte la majorité des déterminants responsables de la stimulation des cellules dendritiques murines observées avec les virions Ad5, le capsomère complet Pn, la protéine fibre complète, et la protéine recombinante du domaine tête de la fibre isolée.

EXEMPLE 3 : Absence de fixation du domaine tête de la protéine fibre d'adénovirus au récepteur CAR.

Dans la littérature, on a largement montré que les cellules dendritiques n'expriment pas le récepteur CAR.

Cependant, on a analysé, par cytométrie de flux (FACS) l'expression de cette protéine cruciale pour la fixation du domaine tête sur les cellules dendritiques différenciées, dans les conditions de culture utilisées dans le présent travail.

On a utilisé, comme témoin positif, des cellules HeLa qui sont connues pour exprimer environ de 10.000 à 30.000 molécules CAR cellule, et des cellules de la lignée CHO en tant que témoin négatif.

On n'a pu détecter aucune expression de CAR au-dessus du bruit de fond des ascites témoins sur les cellules dendritiques immatures

recueillies avant stimulation, en dépit d'une coloration hautement spécifique des cellules HeLa, comme cela est illustré sur la figure 5A.

On a réalisé des tests afin de déterminer si le mécanisme de stimulation des cellules dendritiques par le domaine tête impliquait une pénétration effective de l'adénovirus et une expression de ce gène. On a utilisé un vecteur adénoviral de sérotype 5 codant une protéine « Enhanced Green Fluorescent Protein » (EGFP) à deux valeurs d'indice d'infection (MOI) 10.000 et 30.000. Comme cela est illustré sur la figure 4C, un indice MOI de 10 000 particules virales par cellule induit en effet une maturation efficace des cellules dendritiques. Cependant, une expression significative de la protéine fluorescente EGFP par les cellules dendritiques n'a été observée qu'à la dose de 30 000 particules par cellule (figure 4C) ce qui indique un faible degré de permissivité à l'infection, par l'adénovirus des cellules dendritiques.

15

EXEMPLE 4- Cartographie de la région du domaine tête de la protéine fibre responsable de la maturation des cellules dendritiques.

On a testé l'induction de la maturation des cellules dendritiques avec quatre mutants de protéine fibre de l'adénovirus Ad5 portant des délétions dans le domaine tête (figures 6A et 6B). La délétion présente dans la protéine fibre recombinante $\Delta 402-481$ recouvre la boucle peptidique AB, les feuillets β B et C, la boucle peptidique CD ainsi que la partie N-terminale de la boucle peptidique DG. La protéine fibre recombinante mutée Fi Δ HI est seulement dépourvue de la boucle peptidique HI. Deux autres protéines Fi mutées recombinantes, respectivement Fi Δ EF et Fi Δ LT485-486, portent des délétions dans la région courte du double feuillet β anti-parallèle EF (Fi Δ EF), ou une délétion des deux résidus d'acides aminés I485 et T486 qui forment le feuillet β F (Fi Δ LT485-486) (voir Kirky et al., 2000 et Xia et al., 1993).

Les protéines Fi mutées Fi Δ EF et Fi Δ LT 485-486 se présentent sous la forme de fibres trimériques, alors que les protéine Fi mutées Fi Δ 402-481 et Δ HI sont déficientes pour la trimérisation de la fibre (voir Santis et al., 1999).

On a comparé l'activité de maturation des cellules dendritiques du domaine tête sauvage (WT) et des protéines fibres mutantes décrites dans la figure 6B, dans un test de réaction lymphocytaire mixte (MLR).

On a utilisé quatre fois moins de domaine tête sauvage (WT) que de protéine fibre mutée, pour stimuler les cellules dendritiques, afin d'avoir dans tous les essais approximativement la même quantité de domaine tête.

Comme cela est illustré sur la figure 6C, le mutant FiΔHi a conservé la totalité de l'activité de maturation des cellules dendritiques portées par le domaine tête sauvage, ce qui implique que la boucle peptidique Hi distale ainsi que la structure sous forme de trimère du domaine tête ne sont pas requis pour l'induction de la maturation des cellules dendritiques.

Les trois autres protéines fibre mutées, respectivement FiΔ402-481, FiΔEF et FiΔLT 485-486 n'ont pas induit de maturation des cellules dendritiques, ce qui suggère que la région en double feuillet β anti-parallèle EF, et plus spécifiquement le feuillet β court F, est indispensable pour l'effet de maturation des cellules dendritiques.

Pour une évaluation de l'effet *in vivo*, on a comparé les cellules dendritiques stimulées avec le domaine tête de la protéine fibre avec des cellules dendritiques stimulées avec d'autres composants de l'adénovirus, pour leur efficacité dans l'induction d'une réponse cellulaire T CD8⁺ spécifique du peptide GP33 dérivé de la glycoprotéine du LCMV, qui est restreint à l'haplotype D^b.

On a utilisé le colorant vital fluorescent CFSE afin de suivre facilement la présence des splénocytes transférés de manière adoptive par analyse de cytométrie de flux et par contrôle de leur élimination par les cellules T CD8⁺ spécifiques induites par l'immunisation par les cellules dendritiques.

Comme cela est illustré sur la figure 7A, la population de cellules de rate marquées au CFSE et chargées avec le peptide GP33 a diminué en 24 heures dans le sang de toutes les souris immunisées avec les cellules dendritiques stimulées par les protéines Pb, Hx, ou la protéine du domaine tête de la fibre et mis en contact avec le peptide GP33.

Cependant, un rejet des cellules significativement plus rapide a été observé chez les souris traitées avec les cellules dendritiques stimulées avec le domaine tête de la fibre, avec une vitesse de rejet similaire à celle observée chez les souris immunisées avec le peptide GP33 émulsifié dans de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA). La courbe de rejet des cellules chez les souris immunisées avec les cellules dendritiques stimulées avec le domaine tête de la fibre est chargée avec le peptide NP366 est identique à la courbe observée chez les souris immunisées avec les cellules dendritiques chargées avec le peptide GP33 et mise en présence de Pb ou Hx, ou encore non-stimulées.

Comme cela est illustré sur la figure 7A, les cellules dendritiques maturés avec le domaine tête de la fibre sont dix fois plus efficaces pour induire le rejet des splénocytes syngéniques que les cellules dendritiques stimulées par les autres composants d'adénovirus, comme cela est suggéré par la comparaison des effets obtenus en immunisant avec 3×10^4 cellules dendritiques stimulées par le domaine tête, à comparer avec les effets obtenus après l'immunisation avec $2,5 \times 10^5$ cellules dendritiques stimulées avec Hx et Pb.

Comme cela est illustré sur la figure 7A, l'analyse des cellules CFSE⁺ dans les rates des souris receveuses, 10 jours après le transfert adoptif, ont fourni des résultats encore plus significatifs 5% des cellules CFSE⁺ ont persisté chez les souris immunisées avec des cellules dendritiques stimulées par le domaine tête de la fibre, alors que les cellules CFSE⁺ représentent respectivement 72% et 60% des cellules CFSE⁺ initiales chez les souris immunisées avec des cellules dendritiques stimulées respectivement par les protéines Pb et Hx.

Dix jours après le transfert adoptif des splénocytes marqués au CFSE (ce qui correspond au Jour 20 après l'immunisation par les cellules dendritiques), on a déterminé le nombre de cellules T CD8⁺ sécrétant l'IFN γ en réalisant des tests ELISPOT *ex vivo*.

Comme cela est illustré sur la figure 7B, on n'a pas observé d'induction significative de cellules T spécifiques du peptide GP33 chez les souris immunisées avec les cellules dendritiques stimulées avec les protéines x ou Pb, puis chargées avec le peptide GP33 et, ni chez les

souris immunisées avec les cellules dendritiques stimulées avec le domaine tête de la fibre et chargées avec le peptide NP366.

En revanche, on a détecté un nombre significatif de cellules T sécrétant l'IFN γ à la fois dans la rate et dans le sang des souris immunisées avec des cellules dendritiques maturées avec le domaine tête de la fibre et chargées avec le peptide GP33.

De manière intéressante, il existe une corrélation entre l'induction de la réponse cellulaire T spécifique du peptide GP33 et le nombre de cellules dendritiques stimulées par le domaine tête de la fibre qui ont été utilisées pour l'immunisation.

En particulier, on n'a détecté aucune réponse après immunisation avec 3×10^4 cellules dendritiques stimulées avec le domaine tête et chargées avec le peptide GP33, en dépit de l'observation du rejet des cellules CFSE $^+$.

On a ensuite testé l'activité cytotoxique de cellules de rate restimulées *in vitro*, mais on n'a observé aucune activité cytolytique spécifique chez les souris immunisées avec 3×10^4 cellules dendritiques non stimulées (NS-DC). En revanche, comme cela est illustré sur la figure 7C, on a montré que les cellules effectrices obtenues avec les cellules dendritiques stimulées par le domaine tête de la fibre étaient capables de lyser les cellules EL4 chargées avec le peptide GP33 avec une grande efficacité.

CONCLUSIONS

Les résultats présentés dans les exemples montrent que l'effet du domaine tête de la protéine fibre sur la maturation des cellules dendritiques dépend de l'intégrité et de la structure du feuillet β F (résidu d'acide aminé en position 485 et 486 de la protéine de fibre complète), mais ne dépend pas d'autres structures du domaine tête, telle que la bouche peptidique HI. De plus, les résultats des exemples montrent que l'activité de maturation des cellules dendritiques induite par le domaine tête de la protéine fibre de l'adénovirus ne requiert pas que le domaine tête se présente sous la forme d'une structure trimérique.

Le demandeur a également montré que bien que ces résultats ne soient pas présentés dans les exemples ci-dessus, une activité de

maturation par stimulation des cellules dendritiques avec un vecteur d'adénovirus portant des fibres chimères constituées d'une partie queue et d'une partie tige de l'adénovirus de sérotype 5 et du domaine tête de l'adénovirus de sérotype 3. Ces derniers résultats montrent que les

5 molécules de surface des cellules dendritiques sont capables de reconnaître des domaines tête d'adénovirus qui sont pourtant distants d'un point de vue phylogénétique.

Ces résultats montrent aussi que l'interaction entre le domaine tête d'un adénovirus et la surface embryonnaire des cellules dendritiques

10 implique vraisemblablement des structures peptidiques secondaires conservées, plutôt que ces résidus d'acides aminés individuels conservés dans le domaine tête.

REFERENCES

- Basak A, Boudreault A, Chen A, Chretien M, Seidah NG, Lazure C.,
Application of the multiple antigenic peptides (MAP) strategy to the
production of prohormone convertases antibodies: synthesis,
5 characterization and use of 8-branched immunogenic peptides. : J Pept
Sci 1995 Nov-Dec;1(6):385-95.
- Bewley et al. Science, 286, 1999, 1579-1583).
- Durmort et al. Virology, 285, 2001, 302-312).
- Hermanson G.T., 1996, Bioconjugate techniques, San Diego : Academic
10 Press, pp 239-242.
- Houben Weil, 1974, In Meuthode der Organischen Chemie, E.Wunsch
ed., vol.15-I et 15-II, Thieme, Stuttgart, Allemagne.
- Hirschowitz, E. A., Weaver, J. D., Hidalgo, G. E., and Doherty, D. E.
(2000) *Gene Ther* 7, 1112-1120.
- 15 Hirschowitz, E.A. J.D. Weaver, et al. (2000). "Murine dendritic cells
infected with adenovirus vectors show signs of activation" *Gene Ther*
7(13):1120-20.
- Hong, S. S., Karayan, L., Tournier, J., Curiel, D. T., and Boulanger, P. A.
(1997) *Embo J* 16, 2294-2306.
- 20 Hong, S. S., Magnusson, M. K., Henning, P., Lindholm, L., and
Boulanger, P. (2003) *Mol Ther* 7, in press
- Karayan, L., Gay, B., Gerfaux, J., and Boulanger, P. A. (1994) *Virology*
202, 782-795
- 25 Kirby, I., Davison, E., Beavil, A. J., Soh, C. P., Wickham, T. J., Roelvink,
P. W., Kovacs, I., Sutton, B. J., and Santis, G. (2000) *J Virol* 74, 2804-
2813.
- Macatonia et al., 1995, J. Immunol., vol.154 :5071 ; Hilkens et al., 1997,
blood, vol.90 : 1920
- 30 Magnusson, M. K., Hong, S. S., Boulanger, P., and Lindholm, L. (2001) *J*
Virol 75, 7280-7289.

- Mayordomo, J. I., Zorina, T., Storkus, W. J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L. D., Melief, C. J., Ildstad, S. T., Kast, W. M., Deleo, A. B., and et al. (1995) *Nat Med* **1**, 1297-1302.
- Merrifield RB, 1965a, *Nature*, Vol.207 (996): 522-523.
- 5 Merrifield rb, 1965b, *Science*, vol. 150 (693): 178-185.
- Molinier-Frenkel, V., Lengagne, R., Gaden, F., Hong, S. S., Choppin, J., Gahery-Segard, H., Boulanger, P., and Guillet, J. G. (2002) *J Virol* **76**, 127-135.
- 10 Morelli, A. E., Larregina, A. T., Ganster, R. W., Zahorchak, A. F., Plowey, J. M., Takayama, T., Logar, A. J., Robbins, P. D., Falo, L. D., and Thomson, A. W. (2000) *J Virol* **74**, 9617-9628
- Morelli A, E, A.T. Larregina, et al. (2000). « Recombinant adenovirus induces maturation of dendritic cells via an NF-kappaB-dependent pathway ». *J. Virol.*74(20);*:9617-9628.
- 15 Novelli, A., and Boulanger, P. A. (1991) *Virology* **185**, 365-376
- Oehen, S., Brduscha-Riem, K., Oxenius, A., and Odermatt, B. (1997) *J Immunol Methods* **207**, 33-42.
- Samoszuk M.K. et al., 1989, *Antibody, Immunoconjugates Radiopharm.*, **2(1)** : 37-46.
- 20 Roth et al., 1996, *Scand. J. Immunol.*, vol.43 :646.
- Rea, D.F.H. Schagen et al. (1999) "Adenoviruses activate human dendritic cells without polarization toward a T-helper type I-inducing subset" *J. Virol.* 73(12):10245-10253.
- Rouard, H.A. Leon et al., (2000). « Adenoviral transduction of human « clinical grade » immature dendritic cells enhances costimulatory molecule expression and T-cell stimulatory capacity ». *J. Immunol. Methods* **241** –1-2):69-81.
- 25 Santis, G., Legrand, V., Hong, S. S., Davison, E., Kirby, I., Imler, J. L., Finberg, R. W., Bergelson, J. M., Mehtali, M., and Boulanger, P. (1999) *J Gen Virol* **80**, 1519-1527.
- 30 Xia, D., Henry, L. J., Gerard, R. D., and Deisenhofer, J. (1994) *Structure*

2, 1259-1270.

Steinman and Young, 1991, Curr. Opin Immunol., vol.3 (3) : 361-372.

REVENDEICATIONS

1. Composé peptidique adjuvant de l'immunité consistant en :
 - 5 - un polypeptide (i) comprenant une séquence d'acides aminés de 30 acides aminés de longueur contenue dans le domaine « tête » de la protéine « fibre » de la capsid d'un adénovirus, ladite séquence d'acides aminés comprenant l'enchaînement d'acides aminés formant la structure en double feuillet β désignée « EF » contenue dans ledit domaine « tête » ; ou
 - 10 - un peptide (ii) analogue dudit polypeptide (i) dont la séquence en acides aminés comporte, par rapport à la séquence dudit polypeptide (i), au moins une substitution ou au moins une délétion d'un acide aminé, ledit peptide analogue conservant ladite structure en double feuillet β désignée « EF ».
- 15 2. Composé peptidique adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que, pour le polypeptide (i), l'enchaînement d'acides aminés formant la structure en double feuillet β désignée « EF » contenue dans le domaine « tête » de la protéine « fibre » de la capsid d'un adénovirus
- 20 est localisé approximativement au centre de la séquence d'acides aminés dudit polypeptide.
3. Composé peptidique adjuvant selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce la longueur du polypeptide (i) est d'au plus 195 acides
- 25 aminés.
4. Composé peptidique adjuvant selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que, pour le polypeptide (i), l'adénovirus est un adénovirus humain.
- 30 5. Composé peptidique adjuvant selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'adénovirus humain est choisi parmi les adénovirus des sous-groupes B ou C.

6. Composé peptidique adjuvant la revendication 4, caractérisé en ce que l'adénovirus humain est choisi dans le groupe constitué des adénovirus des sérotypes 12, 18, 31, 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 1, 2, 5, 6, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 4, 40 et 41.
7. Composé peptidique adjuvant selon la revendication 4, caractérisé en ce que le polypeptide (i) comprend une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences suivantes :
- la séquence débutant à l'acide aminé en position 463 et se terminant à l'acide aminé en position 515 de la séquence SEQ ID N° 1.
 - la séquence débutant à l'acide aminé en position 195 et se terminant à l'acide aminé en position 247 de la séquence SEQ ID N° 2.
 - la séquence débutant à l'acide aminé en position 472 et se terminant à l'acide aminé en position 535 de la séquence SEQ ID N° 3..
8. Composé peptidique adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le peptide analogue (ii) comprend de 2 à 10 substitutions ou délétions d'un acide aminé, par rapport à la séquence d'acides aminés dudit polypeptide (i).
9. Composé adjuvant selon l'une des revendications 1 ou 8, caractérisé en ce que le polypeptide (i) ou le peptide analogue (ii) consiste en un polypeptide cyclique.
10. Composition adjuvante de l'immunité comprenant un composé adjuvant selon l'une des revendications 1 à 9, en association avec au moins un excipient physiologiquement compatible.
11. Conjugué immunogène constitué d'un composé peptidique adjuvant selon l'une des revendications 1 à 9, lié de manière covalente à un antigène à l'encontre duquel une réponse immunitaire est recherchée.

12. Composé adjuvant selon l'une des revendications 1 à 9, ou conjugué immunogène selon la revendication 11, pour son utilisation en tant que principe actif adjuvant d'une composition immunogène ou d'une composition vaccinale.
- 5
13. Utilisation d'un composé adjuvant selon l'une des revendications 1 à 9, ou d'un conjugué immunogène selon la revendication 11, pour la fabrication d'une composition immunogène ou vaccinale.
- 10
14. Composition immunogène comprenant un composé adjuvant selon l'une des revendications 1 à 9, en association avec au moins un antigène.
- 15
15. Composition vaccinale comprenant un composé adjuvant selon l'une des revendications 1 à 9, en association avec au moins un antigène.
16. Procédé pour la maturation *in vitro* des cellules dendritiques immatures humaines ou animales, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 20
- a) cultiver *in vitro* une population de cellules enrichie en cellules dendritiques immatures humaines ou animales, dans un milieu de culture approprié ;
- b) incuber les cellules cultivées à l'étape a) avec un composant adjuvant selon l'une des revendications 1 à 9 ou avec une
- 25
- composition adjuvante selon la revendication 10, pendant une durée suffisante pour induire la maturation des cellules dendritiques.
17. Population de cellules enrichie en cellules dendritiques matures, chargées avec un composé adjuvant selon l'une des revendications 1 à 9
- 30
- ou avec une composition adjuvante selon la revendication 10.
18. Composition cellulaire adjuvante de l'immunité caractérisée en ce qu'elle comprend une population de cellules enrichie en cellules dendritiques matures selon la revendication 17.

19. Procédé pour fabriquer une composition cellulaire immunogène, caractérisée en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 a) cultiver *in vitro* une population de cellules enrichie en cellules dendritiques immatures humaines ou animales, dans un milieu de culture approprié ;
- b) incuber les cellules cultivées à l'étape a) avec un composé peptidique adjuvant selon l'une des revendications 1 à 9 ou avec une composition adjuvante selon la revendication 10, pendant une durée suffisante pour induire la maturation des cellules dendritiques ;
- 10 c) ajouter aux cellules cultivées à l'étape b) au moins un antigène à l'encontre duquel une réponse immunitaire est recherchée.

20. Procédé pour fabriquer une composition cellulaire immunogène, caractérisée en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 15 a) cultiver *in vitro* une population de cellules enrichie en cellules dendritiques immatures humaines ou animales, dans un milieu de culture approprié ;
- b) incuber les cellules cultivées à l'étape a) avec un conjugué immunogène selon la revendication 11, pendant une durée suffisante
- 20 pour induire la maturation des cellules dendritiques.

21. Composition cellulaire immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend une population de cellules dendritiques matures chargées (i) avec un composé adjuvant selon l'une des revendications 1 à 9 ou avec
- 25 une composition adjuvante selon la revendication 10, et (ii) chargées avec l'antigène d'intérêt.

1/7

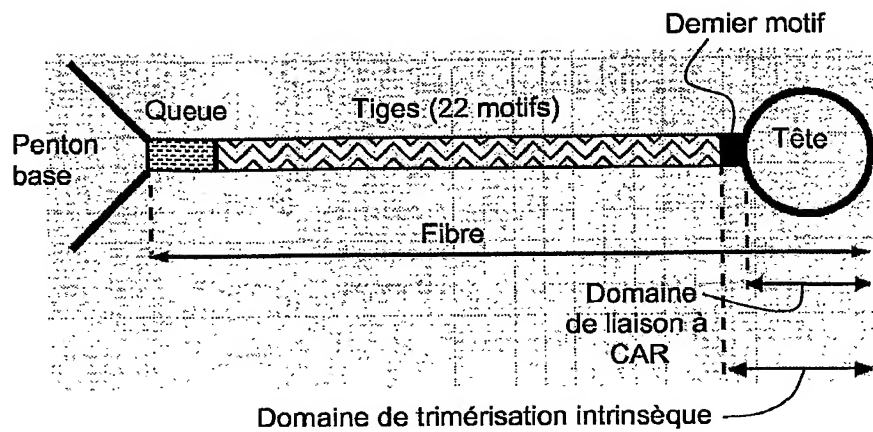


FIGURE 1A

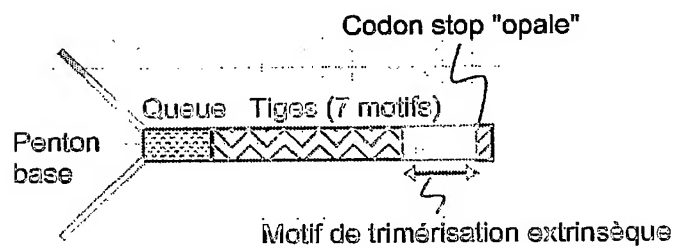


FIGURE 1B

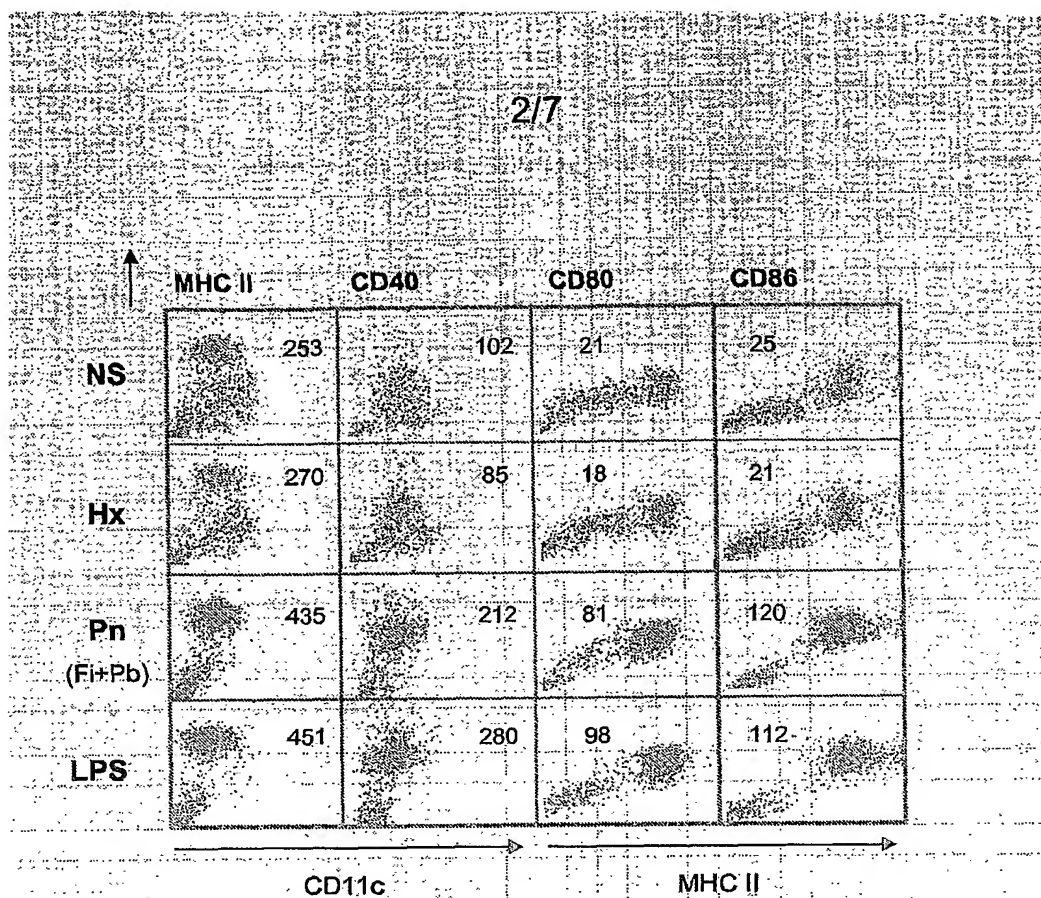


FIGURE 2A

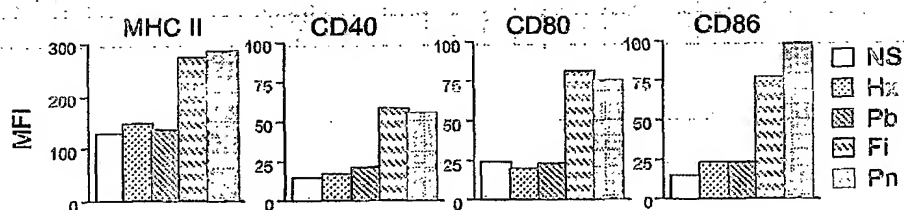


FIGURE 2B

3/7

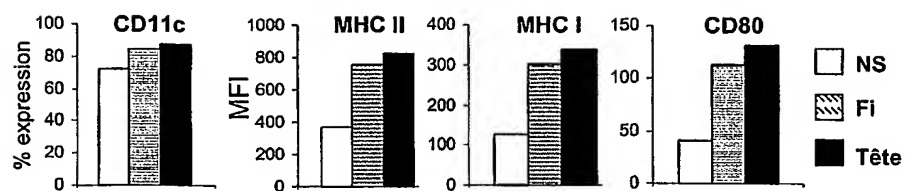


FIGURE 3A

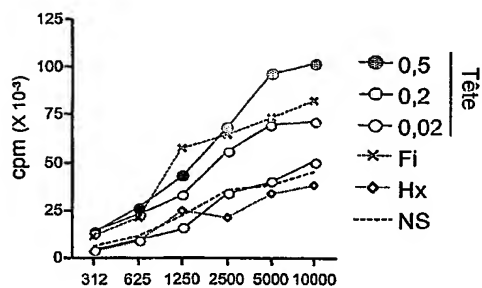


FIGURE 3B

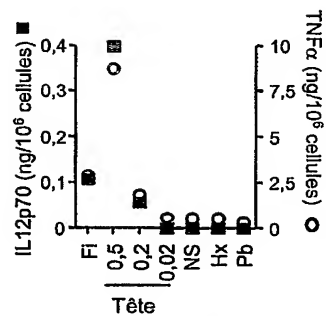


FIGURE 3C

4/7

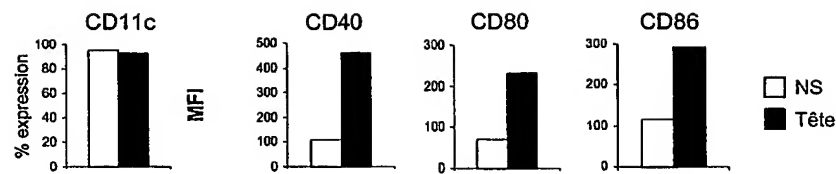


FIGURE 4A

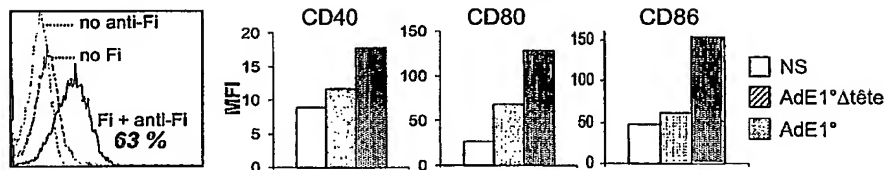


FIGURE 4B

FIGURE 4C

5/7

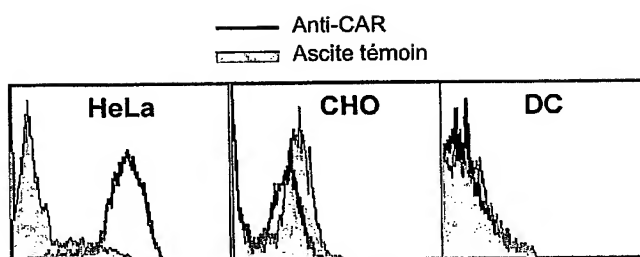


FIGURE 5

6/7

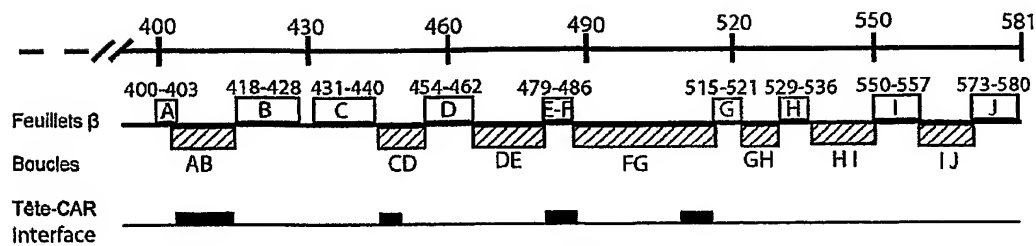


FIGURE 6A

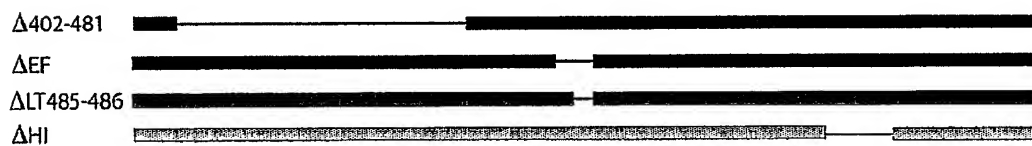


FIGURE 6B

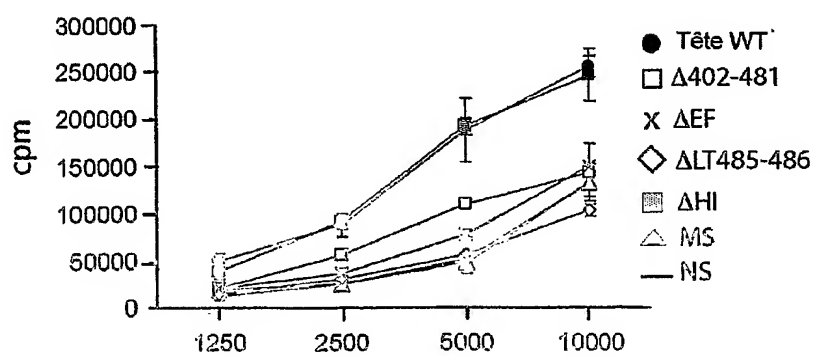


FIGURE 6C

7/7

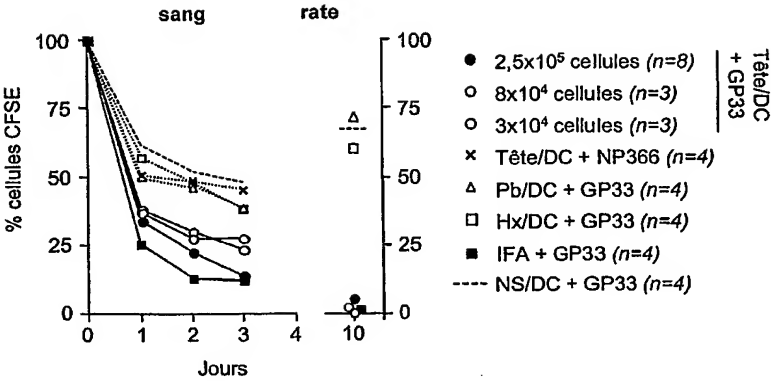


FIGURE 7A

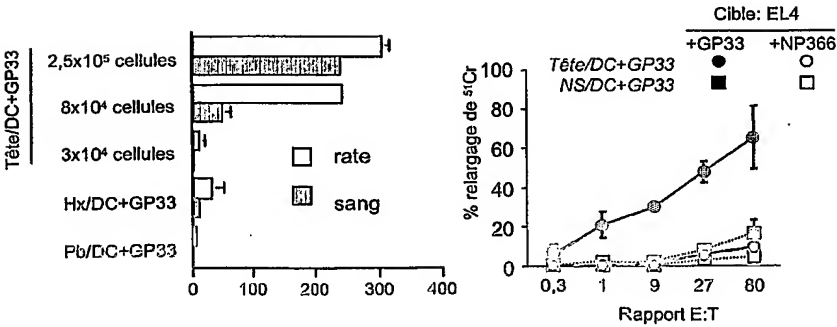


FIGURE 7A

FIGURE 7B

LISTE DE SEQUENCES

<110> Institut National de la Santé et de la Recherche M
Centre National de la Recherche Scientifique

<120> Nouveau composé adjuvant de l'immunité, compositions le
contenant et procédés mettant en oeuvre ledit composé
adjuvant

<130> P336-FR

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 581

<212> PRT

<213> Adenovirus type 5

<400> 1

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu
50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn
85 90 95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu
100 105 110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr
115 120 125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile
130 135 140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln
145 150 155 160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr
165 170 175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu
180 185 190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

| 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Pro | Leu | His | Val | Thr | Asp | Asp | Leu | Asn | Thr | Leu | Thr | Val | Ala | Thr |
| 210 | | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Gly | Pro | Gly | Val | Thr | Ile | Asn | Asn | Thr | Ser | Leu | Gln | Thr | Lys | Val | Thr |
| 225 | | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | 240 |
| Gly | Ala | Leu | Gly | Phe | Asp | Ser | Gln | Gly | Asn | Met | Gln | Leu | Asn | Val | Ala |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| Gly | Gly | Leu | Arg | Ile | Asp | Ser | Gln | Asn | Arg | Arg | Leu | Ile | Leu | Asp | Val |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| Ser | Tyr | Pro | Phe | Asp | Ala | Gln | Asn | Gln | Leu | Asn | Leu | Arg | Leu | Gly | Gln |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| Gly | Pro | Leu | Phe | Ile | Asn | Ser | Ala | His | Asn | Leu | Asp | Ile | Asn | Tyr | Asn |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| Lys | Gly | Leu | Tyr | Leu | Phe | Thr | Ala | Ser | Asn | Asn | Ser | Lys | Lys | Leu | Glu |
| 305 | | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | 320 |
| Val | Asn | Leu | Ser | Thr | Ala | Lys | Gly | Leu | Met | Phe | Asp | Ala | Thr | Ala | Ile |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Ala | Ile | Asn | Ala | Gly | Asp | Gly | Leu | Glu | Phe | Gly | Ser | Leu | Asn | Ala | Pro |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | | 350 | |
| Asn | Ser | Asn | Pro | Leu | Lys | Thr | Lys | Ile | Gly | His | Gly | Leu | Glu | Phe | Asp |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| Ser | Asn | Lys | Ala | Met | Val | Pro | Lys | Leu | Gly | Thr | Gly | Leu | Ser | Phe | Asp |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| Ser | Thr | Gly | Ala | Ile | Thr | Val | Gly | Asn | Lys | Asn | Asn | Asp | Lys | Leu | Thr |
| 385 | | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | 400 |
| Leu | Trp | Thr | Thr | Pro | Ala | Pro | Ser | Pro | Asn | Cys | Arg | Leu | Asn | Ala | Glu |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | |
| Lys | Asp | Ala | Lys | Leu | Thr | Leu | Val | Leu | Thr | Lys | Cys | Gly | Ser | Gln | Ile |
| | | 420 | | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| Leu | Ala | Thr | Val | Ser | Val | Leu | Ala | Val | Lys | Gly | Ser | Leu | Ala | Pro | Ile |
| | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | |
| Ser | Gly | Thr | Val | Gln | Ser | Ala | His | Leu | Ile | Ile | Arg | Phe | Asp | Glu | Asn |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | |
| Gly | Val | Leu | Leu | Asn | Asn | Ser | Phe | Leu | Asp | Pro | Glu | Tyr | Trp | Asn | Phe |
| 465 | | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | 480 |
| Arg | Asn | Gly | Asp | Leu | Thr | Glu | Gly | Thr | Ala | Tyr | Thr | Asn | Ala | Val | Gly |
| | | | 485 | | | | | 490 | | | | | | 495 | |
| Phe | Met | Pro | Asn | Leu | Ser | Ala | Tyr | Pro | Lys | Ser | His | Gly | Lys | Thr | Ala |
| | | 500 | | | | | 505 | | | | | | 510 | | |
| Lys | Ser | Asn | Ile | Val | Ser | Gln | Val | Tyr | Leu | Asn | Gly | Asp | Lys | Thr | Lys |
| | 515 | | | | | 520 | | | | | | 525 | | | |

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp
530 535 540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly
545 550 555 560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser
565 570 575

Tyr Ile Ala Gln Glu
580

<210> 2

<211> 319

<212> PRT

<213> Adenovirus type 3

<400> 2

Met Ala Lys Arg Ala Arg Leu Ser Thr Ser Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1 5 10 15

Tyr Glu Asp Glu Ser Asn Leu Gln His Pro Phe Ile Asn Pro Gly Phe
20 25 30

Ile Ser Pro Asp Gly Phe Thr Gln Ser Pro Asn Gly Val Leu Ser Leu
35 40 45

Lys Cys Val Asn Pro Leu Thr Thr Ala Ser Gly Ser Leu Gln Leu Lys
50 55 60

Val Gly Ser Gly Leu Thr Val Asn Thr Thr Asp Gly Ser Leu Glu Glu
65 70 75 80

Asn Ile Lys Val Asn Thr Pro Leu Thr Lys Ser Asn His Ser Ile Asn
85 90 95

Leu Pro Ile Gly Asn Gly Leu Gln Ile Glu Gln Asn Lys Leu Cys Ser
100 105 110

Lys Leu Gly Asn Gly Leu Thr Phe Asp Ser Ser Asn Ser Ile Ala Leu
115 120 125

Lys Asn Asn Thr Leu Trp Thr Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asn Cys Ile
130 135 140

Ile Glu Tyr Gly Lys Glu Asn Pro Asp Ser Lys Leu Thr Leu Ile Leu
145 150 155 160

Val Lys Asn Gly Gly Ile Val Asn Gly Tyr Val Thr Leu Met Gly Ala
165 170 175

Ser Asp Tyr Val Asn Thr Leu Phe Lys Asn Lys Asn Val Ser Ile Asn
180 185 190

Val Glu Leu Tyr Phe Asp Ala Thr Gly His Ile Leu Pro Asp Leu Ser
195 200 205

Ser Leu Lys Thr Asp Leu Gln Leu Lys Tyr Lys Gln Thr Thr His Phe

210 215 220
 Ser Ala Arg Gly Phe Met Pro Ser Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Val Leu
 225 230 235 240
 Pro Asn Ala Gly Thr Asp Asn Glu Asn Tyr Ile Phe Gly Gln Cys Tyr
 245 250 255
 Tyr Lys Ala Ser Asp Gly Ala Leu Phe Pro Leu Glu Val Thr Val Thr
 260 265 270
 Leu Asn Lys Arg Leu Pro Asp Ser Arg Thr Ser Tyr Val Met Thr Phe
 275 280 285
 Leu Trp Ser Leu Asn Ala Gly Leu Ala Pro Glu Thr Thr Gln Ala Thr
 290 295 300
 Leu Ile Thr Ser Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Ile Arg Glu Asp Asp
 305 310 315

<210> 3

<211> 587

<212> PRT

<213> Adenovirus type 12

<400> 3

Met Lys Arg Ser Arg Thr Gln Tyr Ala Glu Glu Thr Glu Glu Asn Asp
 1 5 10 15
 Asp Phe Asn Pro Val Tyr Pro Phe Asp Pro Phe Asp Thr Ser Asp Val
 20 25 30
 Pro Phe Val Thr Pro Pro Phe Thr Ser Ser Asn Gly Leu Gln Glu Lys
 35 40 45
 Pro Pro Gly Val Leu Ala Leu Asn Tyr Lys Asp Pro Ile Val Thr Glu
 50 55 60
 Asn Gly Thr Leu Thr Leu Lys Leu Gly Asp Gly Ile Lys Leu Asn Ala
 65 70 75 80
 Gln Gly Gln Leu Thr Ala Ser Asn Asn Ile Asn Val Leu Glu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Asn Thr Ser Gln Gly Leu Lys Leu Ser Trp Ser Ala Pro Leu Ala
 100 105 110
 Val Lys Ala Ser Ala Leu Thr Leu Asn Thr Arg Ala Pro Leu Thr Thr
 115 120 125
 Thr Asp Glu Ser Leu Ala Leu Ile Thr Ala Pro Pro Ile Thr Val Glu
 130 135 140
 Ser Ser Arg Leu Gly Leu Ala Thr Ile Ala Pro Leu Ser Leu Asp Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Asn Leu Gly Leu Asn Leu Ser Ala Pro Leu Asp Val Ser Asn
 165 170 175

Asn Asn Leu His Leu Thr Thr Glu Thr Pro Leu Val Val Asn Ser Ser
 180 185 190
 Gly Ala Leu Ser Val Ala Thr Ala Asp Pro Ile Ser Val Arg Asn Asn
 195 200 205
 Ala Leu Thr Leu Pro Thr Ala Asp Pro Leu Met Val Ser Ser Asp Gly
 210 215 220
 Leu Gly Ile Ser Val Thr Ser Pro Ile Thr Val Ile Asn Gly Ser Leu
 225 230 235 240
 Ala Leu Ser Thr Thr Ala Pro Leu Asn Ser Thr Gly Ser Thr Leu Ser
 245 250 255
 Leu Ser Val Ala Asn Pro Leu Thr Ile Ser Gln Asp Thr Leu Thr Val
 260 265 270
 Ser Thr Gly Asn Gly Leu Gln Val Ser Gly Ser Gln Leu Val Thr Arg
 275 280 285
 Ile Gly Asp Gly Leu Thr Phe Asp Asn Gly Val Met Lys Val Asn Val
 290 295 300
 Ala Gly Gly Met Arg Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Leu Asp Val Asn
 305 310 315 320
 Tyr Pro Phe Asp Ala Ser Asn Asn Leu Ser Leu Arg Arg Gly Leu Gly
 325 330 335
 Leu Ile Tyr Asn Gln Ser Thr Asn Trp Asn Leu Thr Thr Asp Ile Ser
 340 345 350
 Thr Glu Lys Gly Leu Met Phe Ser Gly Asn Gln Ile Ala Leu Asn Ala
 355 360 365
 Gly Gln Gly Leu Thr Phe Asn Asn Gly Gln Leu Arg Val Lys Leu Gly
 370 375 380
 Ala Gly Leu Ile Phe Asp Ser Asn Asn Asn Ile Ala Leu Gly Ser Ser
 385 390 395 400
 Ser Asn Thr Pro Tyr Asp Pro Leu Thr Leu Trp Thr Thr Pro Asp Pro
 405 410 415
 Pro Pro Asn Cys Ser Leu Ile Gln Glu Leu Asp Ala Lys Leu Thr Leu
 420 425 430
 Cys Leu Thr Lys Asn Gly Ser Ile Val Asn Gly Ile Val Ser Leu Val
 435 440 445
 Gly Val Lys Gly Asn Leu Leu Asn Ile Gln Ser Thr Thr Thr Thr Val
 450 455 460
 Gly Val His Leu Val Phe Asp Glu Gln Gly Arg Leu Ile Thr Ser Thr
 465 470 475 480
 Pro Thr Ala Leu Val Pro Gln Ala Ser Trp Gly Tyr Arg Gln Gly Gln
 485 490 495
 Ser Val Ser Thr Asn Thr Val Thr Asn Gly Leu Gly Phe Met Pro Asn

500 505 510

Val Ser Ala Tyr Pro Arg Pro Asn Ala Ser Glu Ala Lys Ser Gln Met
515 520 525

Val Ser Leu Thr Tyr Leu Gln Gly Asp Thr Ser Lys Pro Ile Thr Met
530 535 540

Lys Val Ala Phe Asn Gly Ile Thr Ser Leu Asn Gly Tyr Ser Leu Thr
545 550 555 560

Phe Met Trp Ser Gly Leu Ser Asn Tyr Ile Asn Gln Pro Phe Ser Thr
565 570 575

Pro Ser Cys Ser Phe Ser Tyr Ile Thr Gln Glu
580 585

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.